

PUBLICATIONS DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY
COLLECTION DES THÈSES DE LA FACULTÉ DES SCIENCES
SCIENCES NATURELLES

PREMIÈRE THÈSE

Biosynthèse
des Caroténoïdes Cycliques de Levures
du Genre Rhodotorula

DEUXIÈME THÈSE

Aspects biochimiques de la croissance microbienne
à partir de sources carbonées en C₁

Présentées à la Faculté des Sciences de l'Université de Nancy
pour obtenir le grade de Docteur ès-Sciences Naturelles

par **Roger BONALY**

Pharmacien

Licencié ès-Sciences

Assistant à la Faculté de Pharmacie de Nancy

soutenues le 24 Mai 1967

devant la Commission d'Examen

JURY :

M. **MANGENOT**, Président

M. **GAY**,

M. **LEVISALLES**, Examinateurs

M. **VILLOUTREX**,

1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

PUBLICATIONS DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

COLLECTION DES THÈSES DE LA FACULTÉ DES SCIENCES

SCIENCES NATURELLES

PREMIÈRE THÈSE

Biosynthèse des Caroténoïdes Cycliques de Levures du Genre *Rhodotorula*

DEUXIÈME THÈSE

Aspects biochimiques de la croissance microbienne à partir de sources carbonées en C₁

Présentées à la Faculté des Sciences de l'Université de Nancy
pour obtenir le grade de Docteur ès-Sciences Naturelles

par **Roger BONALY**

Pharmacien

Licencié ès-Sciences

Assistant à la Faculté de Pharmacie de Nancy

soutenues le 24 Mai 1967

devant la Commission d'Examen

JURY :

M. **MANGENOT**, Président

M. **GAY**,

M. **LEVISALLES**, Examinateurs

M. **VILLOUTREX**,

1967



Doyen : M. AUBRY

Assesseur : M. GAY

Doyens honoraires : MM. CORNUBERT - DELSARTE - ROUBAULT.

Professeurs honoraires : MM. RAYBAUD - LAFFITTE - LERAY - JULY - LAPORTE - EICHHORN - GODEMENT - DUBREUIL - L. SCHWARTZ - DIEUDONNE - DE MALLEMANN - LONGCHAMBON - LETORT - DODE - GAUTHIER - GOUDET - OLMER - CORNUBERT - CHAPELLE - GUERIN - WAHL.

Maîtres de conférences honoraires : MM. LIENHART - PIERRET.

Professeurs

MM. DELSARTE	Analyse supérieure	* MALAPRADE	Chimie
ROUBAULT	Géologie	MANGENOT	Botanique
CAPELLE	Méca. Rationnelle	GAYET	Physiologie
VEILLET	Biologie animale	BONVALET	Méca. appliquée
BARRIOL	Chimie théorique	HADNI	Physique
BIZETTE	Physique	* BASTICK	Chimie
GUILLIEN	Electronique	DUCHAUFOR	Pédologie
GILBERT	Chimie physique	GARNIER	Agronomie
LEGRAS	Méca. Rationnelle	NEEL	Chimie org.indus.
BOLFA	Minér. & crist.	BERNARD	Géologie appliquée
NICLAUSE	Chimie	* CHAMPIER	Physique
FAIVRE	Phys. appliquée	* GAY	Chimie biologique
AUBRY	Chimie minérale	STEPHAN	Zoologie
COPPENS	Radiogéologie	* CONDE	Zoologie
DUVAL	Chimie	* WERNER	Botanique
FRUHLING	Physique	EYMARD	Calcul dif. & int.
HILLY	Géologie	LEVISALLES	Chimie organique
LE GOFF	Génie chimique	Mme HERVE	M.M.P.
SUHNER	Phys. expériment.	* GOSSE	Méca. physique
CHAPON	Chimie biologique	FELDEN	Physique
HEROLD	Chimie minér. indus.	* DAVOINE	Physique (E.N.S.M.I.M.)
SCHWARTZ B.	Exploitation minière	N...	Chimie biologique

* Professeur titulaire à titre personnel.

Maîtres de Conférences

Mme BASTICK	Chimie M.P.C. (Epinal)	MARTIN	Chimie M.P.C.
MM. GUDEFIN	Physique	PAULMIER	Méca. expérimentale
ROCCI	Géologie	PROTAS	Minéralogie
VUILLAUME	Psychophysio.	COURTILLOT	Mécanique des Fluides
FRENTZ	Biol. animale	JOZEFOWICZ	Physico-chimie
HORN	Phys. propédeutique	JURAIN	Géologie (S.P.C.N.)
LAFON	Phys. (I.S.I.N.)	RIVAIL	Chimie appl. (C.U.C.E.)
MARI	Chimie (I.S.I.N.)	VILLERMAUX	Génie chimique
AUROUZE	Géologie	METCHE	Biochimie appl. (Brass.)
DEVIOT	Physi. du solide	N...	Proba. & statistiques
FLECHON	Physique M.P.C.	N...	Mécanique (I.S.I.N.)
Mle HUET *	Math. (S.P.C.N.)	N...	Mathématiques
MM VIGNES	Métallurgie	N...	Mathématiques M.P.C.
BALESDENT	Thermodynam. chim.	N...	Mathématiques S.P.C.N.
BLAZY	Minéral. appl. (E.N.S.G.)	N...	Mathématiques appliquées
JANOT	Phys. M.P.C. (Epinal)	N...	Méca. des fluides (I.S.I.)
JACQUIN	Pédol. & chim. agricole	N...	Physiologie animale
MAINARD	Physique M.G.P.	N...	Mathématiques M.P.
CACHAN	Ento. appl. (E.N.S.A.)		

* en disponibilité

Secrétaire principal : C. CARON

A ma Femme et à mes Enfants
A mes Parents
A tous les Miens

en témoignage de ma profonde affection

AVANT-PROPOS

Avant d'entreprendre l'exposé de ce travail il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à sa réalisation.

A la mémoire de Monsieur le Doyen Kayser qui m'a fait le grand honneur de m'accueillir dans son laboratoire dès le début de mes études de pharmacie. Je dois à ce maître dont la rigueur scientifique restera pour moi un modèle, mon orientation dans la voie attrayante mais très austère de la recherche scientifique.

Je remercie Monsieur le Professeur Mangenot qui m'a toujours accordé un accueil bienveillant et m'a fait l'honneur d'accepter de présider cette thèse.

Ma reconnaissance va également à Monsieur le Professeur Gay qui malgré ses lourdes charges à bien voulu analyser ce travail.

Monsieur le Professeur Levisalles voudra bien trouver ici mon témoignage de reconnaissance pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant de juger cette thèse.

Je prie Monsieur Villoutreix, qui m'a proposé le sujet de cette étude, de croire à l'expression de mes très vifs et très sincères remerciements. Sa grande compétence scientifique, la rigueur de son raisonnement et ses conseils éclairés m'ont permis la réalisation de cette thèse.

Je dois à Monsieur le Professeur Pierfitte un appui scientifique et moral qui ne m'a jamais fait défaut. Pour son inlassable bienveillance je tiens à l'assurer de toute ma gratitude.

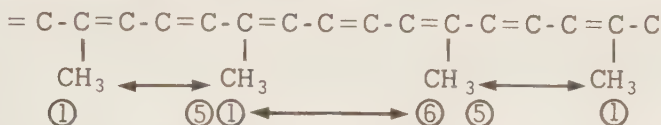
Je ne voudrais oublier Monsieur J.P. Malangé chargé de recherche qui m'a toujours témoigné sa sympathie et s'est largement mis à ma disposition pour toutes les études cinétiques.

Au laboratoire, je tiens à remercier très sincèrement Mademoiselle F. Hasser et Monsieur J.F. Barrat pour l'aide qu'ils m'ont apportée lors de la réalisation de nombreuses manipulations délicates.

A tous mes maîtres des Facultés de Pharmacie et des Sciences de Nancy, j'adresse mes sincères remerciements pour leurs enseignements.

INTRODUCTION

Les caroténoïdes sont des composés naturels tétraterpéniques caractérisés par la présence dans leur molécule de doubles liaisons conjuguées, qui leur confèrent une coloration plus ou moins intense, variant du jaune au rouge. Le squelette carboné de la molécule est composé en général de huit unités isopréniques reliées de telle sorte qu'au centre de la chaîne les deux méthyles se trouvent en position 1-6, tandis que les autres groupements méthyles se placent en position 1-5.



A l'encontre des triterpènes, les caroténoïdes n'ont pas tendance à se cycliser sauf aux extrémités de la chaîne, ce qui peut être attribué à une rigidité de la molécule due au système de doubles liaisons conjuguées.

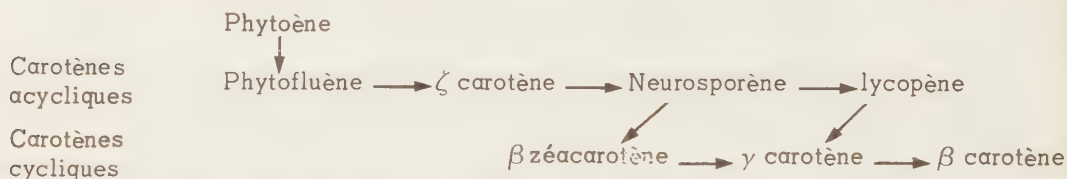
On classe habituellement les caroténoïdes en trois catégories, les hydrocarbures polyéniques acycliques dont le lycopène est le type, les dérivés monocycliques tel le γ carotène, enfin les polyènes bicycliques comme le β carotène. Dans chacune de ces catégories, on rencontre des dérivés hydroxylés, carbonylés, carboxylés et méthoxylés. Actuellement près de 150 caroténoïdes ont été isolés et leur répartition, aussi bien dans le règne végétal qu'animal, a fait l'objet de nombreuses publications et mises au point récentes (19 - 25).

Si des caroténoïdes comme le β carotène sont largement répandus dans la nature, d'autres ont une distribution beaucoup plus restreinte parfois même limitée à quelques espèces. Ainsi deux caroténoïdes semblent plus particulièrement responsables de la coloration rouge foncé que présentent habituellement les levures du genre *Rhodotorula* : ce sont le torulène découvert par LEDERER dans la levure *Rhodotorula rubra* (37) et la torularhodine isolée et caractérisée par KARRER et coll. (33). Bien que ce dernier pigment n'ait pas été retrouvé dans toutes les souches (6), il semble cependant caractéristique des levures des genres *Rhodotorula* et *Sporobolomyces*. Le torulène par contre est beaucoup plus répandu qu'on ne le pensait. En effet, sa présence a été signalée chez des champignons tels que *Lycogala epidendron*, *Neurospora crassa* et *Sitophila* (31), ou encore *Verticillium albo-atrum* souche M5 (62).

La plupart des travaux concernant l'étude de la caroténogénèse chez les levures du genre *Rhodotorula* ne mentionnent et de façon constante, que quatre caroténoïdes : la torularhodine, le torulène, le γ et le

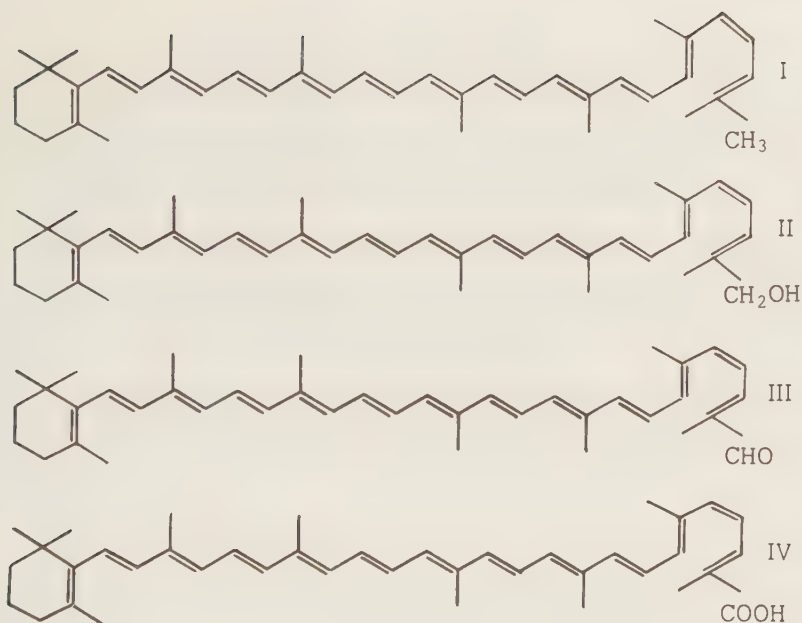
β carotène. Cependant, en plus de ces pigments cycliques (68 - 46), FROMAGEOT et TCHANG (17) dans une variété de *Rh. sarniei* ont mis en évidence à l'état de traces un polyène acyclique, le lycopène, et BONNER et coll. (6) chez *Rh. rubra* ont également trouvé deux pigments acycliques A et B identifiés au neurosporène et au ζ carotène. Le β zéacarotène et le neurosporène ont été caractérisés chez *Rh. mucilaginosa* (63) et chez *Rh. glutinis* (58).

En conséquence si la présence des pigments cycliques est couramment signalée dans ces levures, il n'en est pas de même des polyènes acycliques. Ces résultats ne permettent pas de concevoir à priori chez ces levures l'hypothèse de PORTER et coll. (48 - 49), qui ont proposé un schéma selon lequel les caroténoïdes cycliques proviendraient des polyènes acycliques suivant la filiation :



Chez *Rhodotorula mucilaginosa* (63) le phytoène et le ζ carotène n'apparaissent que lorsque la levure est cultivée en présence de 2-hydroxybiphényle, et chez *Rh. glutinis* (58) la β ionone et la méthylhepténone provoquent la synthèse du phytoène, du phytofluène et du ζ carotène, mais au contraire inhibent partiellement la synthèse des caroténoïdes cycliques. Aussi reste-t-il à démontrer que les pigments qui se synthétisent, représentent de véritables précurseurs des pigments cycliques, et non des produits de déviation sous l'influence de substances telles que le 2-hydroxybiphényle ou la β ionone.

Il existe donc chez ces levures un doute quant à l'origine des caroténoïdes cycliques. Aussi l'objet de notre travail est de définir, chez *Rh. aurantiaca* CBS 2200 dont aucune étude de la caroténogénèse n'a encore été réalisée, et chez *Rh. mucilaginosa*, les précurseurs à partir desquels peuvent se former les caroténoïdes cycliques. D'autre part, nous avons cherché à déterminer le mécanisme de formation de la torularhodine (IV), qui est un pigment caractéristique de ces levures. Selon l'hypothèse de WINTERSTEIN (67) la torularhodine devrait provenir du torulène (I), ce qui n'a pas encore été démontré, de plus comme le montre les formules ci-dessous le mécanisme nécessiterait une oxydation d'un groupement méthyle terminal du torulène, et peu de recherches ont abordé ce problème.



Il semble que l'oxygène atmosphérique soit à l'origine de l'un des oxygènes du carboxyle de la torularhodine, et en biochimie nous connaissons quelques exemples de ce type d'oxydation de méthyle en carboxyle. Ainsi sait-on que *Pseudomonas oleovorans* (2) possède un système enzymatique capable de transformer l'octane en acide octanoïque. Les intermédiaires isolés au cours de cette réaction sont l'alcool primaire et l'aldéhyde correspondant. Aussi est-il possible d'envisager que le premier composé susceptible de se former lors de l'oxydation du torulène est un alcool primaire en C40 (II), mais qui n'a jamais été signalé à l'état naturel. Quant à l'aldéhyde en C40 (III), seuls WINTERSTEIN et coll. (67) l'ont identifié dans un microorganisme non désigné, et son existence n'a pas encore été confirmée.

L'étude de la biosynthèse des pigments cycliques entraîne évidemment la nécessité de connaître le plus exactement possible la nature des caroténoïdes formés par les levures, y compris les pigments mineurs dont le rôle d'intermédiaire ne peut être rejeté à priori.

Nous nous sommes donc, dans une première partie de notre travail, efforcés de connaître au mieux la composition en caroténoïdes de nos souches de *Rhodotorula* dans diverses conditions de cultures.

Mais un examen même approfondi de la composition en pigments après culture des microorganismes, est insuffisant pour permettre l'interprétation d'une filiation, car l'absence ou la faible teneur de certains polyènes chez ces levures peuvent être attribuées à un rôle d'intermédiaire très actif. Aussi avons-nous dans une deuxième partie poursuivi notre travail par une étude de la cinétique de la formation des caroténoïdes dans les cellules.

Enfin, dans une troisième partie, nous avons tenté d'interpréter un phénomène nouveau que nous avons observé chez ces levures du genre *Rhodotorula*, à savoir une excrétion de porphyrines concomitante d'une perturbation de la caroténogénèse.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

a) MATERIEL

Microorganismes

Nous avons utilisé deux espèces de levures appartenant au genre *Rhodotorula* : *Rhodotorula aurantiaca*, souche CBS 2200 (*) et *Rhodotorula mucilaginosa*, souche RMP isolée au laboratoire.

Nous avons également étendu notre étude à deux mutants RJ₁ et RO₁, obtenus par irradiation ultraviolette de la souche RMP. Ces mutants présentent une grande stabilité de la composition en caroténoïdes depuis une dizaine d'années.

Solvants utilisés

L'éther de pétrole est distillé pour obtenir la fraction passant entre 40 et 60°C puis filtré sur une colonne de gel de silice Merck 0,2-0,8 mm contenant 20 % de nitrate d'argent. Ce traitement élimine de manière très satisfaisante les dérivés sulfurés et diverses impuretés particulièrement gênantes lors des séparations chromatographiques.

Nous avons utilisé, pour réaliser certaines chromatographies et certains spectres, de l'éther de pétrole exempt d'hydrocarbures benzéniques, ce qui nous a contraint à une purification du solvant commercial. Pour l'effectuer, 6 à 7 litres d'éther de pétrole sont agités à l'aide d'un vibromixer (E-1 de Dietrich) avec 500 ml de SO₄H₂ à 33 % en SO₃. Après 5 heures de traitement, l'éther de pétrole est décanté, laissé en contact avec des pastilles de potasse, puis distillé ; nous recueillons la fraction passant entre 30 et 60°C.

L'acétone a été distillée pour éliminer les impuretés fluorescentes.

L'éther sulfurique est séché sur sodium puis distillé.

Les autres solvants tels que méthanol, benzène, chloroforme, sulfure de carbone sont des produits purs pour analyse.

(*) Cette souche a été aimablement mise à notre disposition par Madame N.J.W KREGER-VAN RIJ (Delft) à qui nous adressons ici nos vifs remerciements.

Adsorbants

Pour les chromatographies sur colonne, nous utilisons :

- L'alumine Merck qui après avoir été neutralisée est amenée à l'activité I selon BROCKMAN. Pour obtenir des aluminés d'activité III et V, nous ajoutons respectivement 6 et 15 % d'eau distillée à l'alumine d'activité I.

- Le mélange magnésie-hyflsupercel à parties égales est également fréquemment employé. Mais il est nettement à déconseiller pour la séparation des composés aldéhydiques, car en présence d'acétone des dérivés de condensation de type aldolique peuvent se former.

- Le mélange chaux hydratée-hyflsupercel dans les proportions 1:1 est l'adsorbant utilisé pour séparer les stéréo-isomères du lycopène. Il permet en outre une séparation satisfaisante du torulène et du lycopène.

- Nous avons quelques fois employé en chromatographie la cellulose et le saccharose (tamis n° 90).

Pour la chromatographie sur couche mince, nous avons choisi comme adsorbant le gel de silice G Merck, la cellulose Macherey-Nagel ou Pleuger et le mélange gel de silice G - alumine Merck dans les proportions 2/1.

La chromatographie en phase inversée a été réalisée sur couche mince de cellulose imprégnée d'huile de paraffine ou d'huile d'olive selon la technique de EGGER (14).

Pour les chromatographies en phase gazeuse nous avons employé le chromatographe HY Fi 600 Aerograph dans les conditions suivantes : colonne SE 30 (5 %), de 40 cm sur 3/8 de pouce, avec un débit d'azote R de 40 ml/minute. La détection se fait grâce à un détecteur à ionisation de flamme alimenté par de l'hydrogène (débit 30 ml/minute).

b) METHODES

Conservation des souches

Les levures sont entretenues par des repiquages trimestriels sur un milieu gélosé à base de moût non houblonné.

Culture des microorganismes

Nous avons utilisé essentiellement un milieu de culture semi-synthétique dont la composition est la suivante : saccharose 20g, $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 3g, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 2g, ClNa 0,1g, SO_4Mg $7\text{H}_2\text{O}$ 0,25g, Cl_2Ca anhydre 0,25g, Cl_2Mg $4\text{H}_2\text{O}$ 0,001g, SO_4Zn $7\text{H}_2\text{O}$ 0,001g, BO_3H_3 0,001g, Cl_3Fe 0,0005g, SO_4Cu $5\text{H}_2\text{O}$ 0,0001g, IK 0,0001g, dissous dans 300 à 400 ml d'eau distillée.

Les facteurs de croissance sont introduits sous forme de jus de levure préparé selon le procédé de CONWAY et BREEN (10), et on complète à un litre avec de l'eau distillée.

La stérilisation est effectuée dans un autoclave à 120° pendant 20 à 45 minutes suivant le volume de milieu.

Les cultures de faible volume sont réalisées dans des fioles d'Erlenmeyer de 100 ml contenant 20 ml de milieu (l'aération de ces cultures est assurée par agitation magnétique). Ces fioles sont munies d'une tubulure latérale, qui permet d'effectuer des mesures de croissance sans perturber les conditions de culture. Ces petites cultures servent également d'inoculum soit pour des cultures liquides en boîtes de Roux de 1 litre contenant 800 ml de milieu, soit pour des cultures en ballon de 3 litres renfermant 2 litres de milieu ; nous avons également effectué des cultures de 15 litres dans des ballons de 20 litres, toutes ces cultures étant aérées par barbotage d'un courant d'air stérilisé.

Pour la réalisation des cultures sur milieu solide, le milieu liquide précédant est additionné de gélose à raison de 20g par litre.

Cellules non proliférantes

Dans de nombreuses expériences, pour étudier la caroténogénèse en absence de croissance, nous avons placé les cellules en tampon phosphate monopotassique M/15 à pH 4,6. En effectuant à des temps déterminés des prélèvements de la suspension de levure, nous pouvons étudier la variation de la composition en pigments en fonction du temps.

Inhibition de la caroténogénèse. Elimination de l'inhibiteur. Levée d'inhibition

L'inhibition de la caroténogénèse est obtenue en ajoutant au milieu, avant la stérilisation, une quantité voulue de 2-hydroxybiphényle dissoute dans l'alcool. En fin de croissance cet inhibiteur peut être éliminé soit, par plusieurs lavages successifs à l'eau distillée, soit plus rapidement à l'aide de résine Dowex 1 x². Après centrifugation la masse de levures humides (environ 100g) est remise en suspension dans un à deux litres d'eau distillée ; on l'agite alors en atmosphère d'azote à 3 reprises avec 20 à 30g de résine, qui est chaque fois séparée à l'aide d'un tamis ou d'un filtre en verre fritté G1. Ce traitement enlève la majeure partie de l'inhibiteur, puis, les levures sont encore lavées à deux ou trois reprises avec de l'eau distillée de façon à éliminer les dernières traces de 2-hydroxybiphényle, dont la présence peut être décelée par une réaction colorée des phénols que nous effectuons selon la technique d'EMERSON (15). Débarrassées de l'inhibiteur, les cellules sont alors mises en suspension dans un tampon phosphate et aérées par barbotage d'air ; les levures se colorent, ce qui constitue la "levée d'inhibition".

Extraction des caroténoïdes

Nous récoltons les levures par centrifugation à une température comprise entre 0 et 5° puis nous procédons à l'extraction des caroténoïdes. Il est impossible d'extraire directement, quantitativement et d'une façon reproductible, les caroténoïdes des cellules entières. Différentes méthodes ont été préconisées, épuisement direct à l'aide de solvants tels que l'acétone, le méthanol, puis action de ClH 0,5 N à chaud (46) ou encore destruction des cellules à l'aide d'une presse de FRENCH (58), ou bien broyage des levures dans un mortier avec du sable de quartz et de l'azote liquide (63).

Les techniques d'épuisement des cellules par des solvants, comme celles de broyage au mortier, sont longues et trop favorables à une destruction des pigments. Nous avons utilisé un homogénéiseur MSK Braun, qui permet à l'aide de billes de verre, de broyer les cellules à une température voisine de 0°, sous atmosphère inerte et en 3 à 4 minutes. Le pourcentage de cellules détruites est de 90 % pour environ 20 grammes de levure humide.

Après broyage, la masse cellulaire est extraite par l'acétone jusqu'à décoloration totale. Le résidu solide est séparé par centrifugation ou par filtration sur verre fritté G3, et l'extract acétonique additionné d'eau, est épuisé par de l'éther de pétrole. La phase étherée, dans laquelle peuvent subsister quelques traces d'acétone, est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée à sec au moyen d'une pompe à vide à injection d'air. Le résidu est repris par 50 à 100 ml d'éther de pétrole, additionné d'un égal volume de potasse alcoolique à 10 % et laissé pendant une nuit à l'obscurité à +4°C. Ensuite, après addition d'eau les pigments repassent dans l'éther de pétrole. La solution étherée est lavée jusqu'à neutralité, séchée sur sulfate de sodium anhydre, concentrée sous vide puis chromatographiée.

Lorsque la levure contient un caroténoïde à caractère acide, ce pigment demeure sous forme de sel de potassium dans la phase hydroalcoolique qui reste colorée. Après acidification, obtenue au moyen d'une solution d'acide acétique et en évitant toute élévation de température, le pigment acide est alors extractible par l'éther de pétrole. La solution étherée est lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralité, puis séchée sur sulfate de sodium anhydre.

Séparation et identification des caroténoïdes

Plusieurs chromatographies s'avèrent nécessaires pour réaliser une séparation des différents caroténoïdes. Parmi ceux-ci nous devons distinguer d'une part les composés oxygénés qui contiennent dans leur molécule des groupements époxydes, hydroxyles, carbonyles ou carboxyles et d'autre part les composés hydrocarbures.

a) Caroténoïdes oxygénés

Le pigment de nature acide (que nous isolons au cours de l'extraction), après méthylation par le diazométhane, s'est révélé identique à l'ester méthylé de la torularhodine synthétique. Le produit isolé de la levure et le produit synthétique sont réduits par l'hydruure de lithium et d'aluminium en donnant un alcool dont les caractères chromatographiques et spectroscopiques sont identiques.

La torularhodine facilement altérable doit être immédiatement dosée après son extraction.

Les pigments oxygénés ne contenant pas de carboxyles sont séparés par chromatographie. La solution étherée de pigment est filtrée sur alumine d'activité V.

Les carotènes hydrocarbures sont élués rapidement en une seule fraction par le mélange éther de pétrole-éther sulfurique 98/2 v/v, et il reste sur la colonne des zones jaune, violette, rouge qui s'éluent par le même mélange de solvants mais dont la concentration d'éther sulfurique est progressivement augmentée. De nature très variable suivant les levures, l'identification de ces caroténoïdes est exposée lors de l'étude particulière de chaque souche.

b) Caroténoïdes hydrocarbures

La fraction correspondant aux composés hydrocarbures est soumise à une séparation chromatographique sur alumine I (dans le tableau I nous présentons un type de chromatogramme). Sur cet adsorbant, les différentes zones sont éluées avec de l'éther de pétrole contenant des concentrations croissantes d'éther sulfurique puis d'acétone.

Le *phytoène* s'élué de l'alumine I avec une concentration de 2 % d'éther sulfurique dans l'éther de pétrole. Généralement impur, nous rechromatographions le phytoène sur une colonne de gel de silice contenant 1 % de nitrate d'argent ; l'éluant est l'éther de pétrole exempt de benzène et contenant une concentration de 15 % d'éther sulfurique pour entraîner les impuretés, puis une concentration de 5 % d'acétone pour éluer le phytoène. Le spectre, dont les bandes d'absorption dans l'éther de pétrole se situent à 275 - 285 - 296 $m\mu$, et les caractères chromatographiques du produit ainsi purifié sont conformes à ceux du phytoène.

Le *phytofluène* : ce polyène se caractérise par une fluorescence verte à la lumière de Wood. De l'alumine I il se désorbe avec l'éther de pétrole contenant 8 % d'éther sulfurique.

Ses caractères chromatographiques et le spectre d'absorption qui présente dans l'éther de pétrole des bandes à 332 - 348 - 368 $m\mu$, sont identiques à ceux du phytofluène pur extrait de la tomate.

Le β carotène : ce pigment présente sur la colonne une zone de couleur jaune orangé et s'élue avec 10 % d'éther sulfurique dans l'éther de pétrole.

Les bandes d'absorption dans trois solvants usuels sont :

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| - dans l'éther de pétrole | (428) - 453 - 482 m μ |
| - dans le sulfure de carbone | (460) - 487 - 518 m μ |
| - dans le benzène | (440) - 468 - 498 m μ |

Le β zéacarotène : sur alumine I, ce pigment s'élue avec une concentration de 13 à 15 % d'éther sulfurique dans l'éther de pétrole, mais il est difficile de le séparer du ζ carotène qui le suit immédiatement, et une chromatographie sur le mélange magnésie-hyflosupercel 1/1 s'avère nécessaire. Sur cet adsorbant le β zéacarotène s'élue avec 12 % d'éther sulfurique dans l'éther de pétrole. Ses maxima d'absorption sont :

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| - dans l'éther de pétrole | 406 - 430 - 456 m μ |
| - dans le sulfure de carbone | (432) - 460 - 489 m μ |
| - dans le benzène | (418) - 442 - 470 m μ |

Le ζ carotène : difficilement séparable du β zéacarotène sur alumine I, le ζ carotène peut être plus facilement isolé par chromatographie sur le mélange magnésie-hyflosupercel 1/1. De cet adsorbant il s'élue avec une concentration de 15 à 16 % d'éther sulfurique dans l'éther de pétrole et présente alors un spectre identique à celui proposé par NASH et coll. (43) : maximums

- | | |
|---------------------------|-------------------------|
| - dans l'éther de pétrole | 378 - 399 - 424 m μ |
| - dans le benzène | 386 - 409 - 434 m μ |

Le γ carotène : sur alumine I et sur magnésie-hyflosupercel, ce pigment se reconnaît par une bande orangée peu nette, mais s'élue aisément sans interférer avec d'autres pigments. Sur alumine, le γ carotène s'élue avec de l'éther de pétrole contenant 1-2 % d'acétone, tandis que sur magnésie-hyflosupercel il faut une concentration de 10 % d'acétone pour le désorber.

Le spectre d'absorption présente des maximums situés :

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| - dans l'éther de pétrole | 435 - 461 - 494 m μ |
| - dans le sulfure de carbone | (469) - 499 - 533 m μ |
| - dans le benzène | 453 - 478 - 511 m μ |

Le neurosporène : adsorbé au-dessus du γ carotène sur alumine I, il se caractérise par une zone jaune qui s'élue avec 3 % d'acétone dans l'éther de pétrole. Pour l'éluer de l'adsorbant magnésie-hyflosupercel il faut 15 % d'acétone dans l'éther de pétrole. Facilement isolé, il présente un spectre d'absorption dont les maximums sont situés à 415 - 439 - 469 m μ

dans l'éther de pétrole, identique à celui déterminé par HAXO pour ce pigment (27).

Lycopène - Torulène : ces deux pigments ont les mêmes caractères chromatographiques sur alumine et magnésie-hyflosupercel, et ne peuvent être séparés que sur le mélange chaux hydratée-hyflo-supercel 1/1. Sur cet adsorbant, le torulène s'élue en premier avec le mélange éther de pétrole contenant 15 à 20 % de benzène, le lycopène s'élue ensuite avec du benzène pur.

Les deux pigments présentent respectivement les spectres d'absorption suivants :

	Torulène	Lycopène
- dans l'éther de pétrole	458 - 484 - 518	446 - 474 - 506
- dans le sulfure de carbone	(495) - 523 - 561	479 - 508 - 545
- dans le benzène	475 - 502 - 538	457 - 487 - 522

TABLEAU I

Séparation chromatographique des polyènes hydrocarbures
sur alumine d'activité I

Les zones sont indiquées dans un ordre croissant d'adsorption

Eluant	Zone	Fraction	Produits élués
Ether de pétrole	Incolore	1	non identifié (s)
Ether de pétrole 2% d'éther sulfurique	Incolore Fluorescence bleue	2	Phytoène (produit impur nécessitant une purifica- tion ultérieure)
Ether de pétrole 8% d'éther sulfurique	Jaunâtre Fluorescence verte	3	Phytofluène
Ether de pétrole 10% d'éther sulfurique	Jaune orangé	4	β carotène
Ether de pétrole 13-15% d'éther sulfuri- que	Jaune	5	Mélange de β zéacarotène et de ζ carotène, nécessi- tant une purification ulté- rieure
Ether de pétrole 1-2% d'acétone	Orangé	6	γ carotène
Ether de pétrole 3% d'acétone	Jaune	7	Neurosporène
Ether de pétrole 4-5% d'acétone	Rouge	8	Mélange torulène lycopène nécessitant une purifica- tion ultérieure

Dosages des caroténoïdes

Les pigments en solution dans l'éther de pétrole sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DK 2S.

La formule ci-dessous donne le résultat en μg par gramme de matière sèche :

$$C = \frac{D \times 10}{E} \times V \times \frac{1000}{P}$$

C = concentration du pigment en μg par gramme de matière sèche.

D = densité optique du sommet de la principale bande d'absorption.

V = volume du solvant dans lequel est dissous le pigment.

P = poids sec de levure en gramme.

$E = E_{1\%}^{1\text{ cm}}$ = Coefficient d'extinction à la longueur d'onde du maximum d'absorption dans l'éther de pétrole (voir tableau II).

TABLEAU II

Caractères spectroscopiques des caroténoïdes en solution dans l'éther de pétrole

Une valeur entre parenthèses signifie que le spectre présente un épaulement à la longueur d'onde mentionnée.

Caroténoïdes	Position des maximums d'absorption ($m\mu$)	$E_{1\%}^{1\text{ cm}}$	Référence
Phytoène	275 - 285 - 296	850	51
Phytofluène	332 - 348 - 368	1.540	35
ζ carotène	378 - 399 - 424	2.500	43
Neurosporène	415 - 439 - 469	2.990	27
Lycopène	446 - 474 - 506	3.460	71
β zéacarotène	406 - 430 - 456	2.520	55
γ carotène	435 - 461 - 494	2.760	23
β carotène	(428) - 453 - 482	2.590	20
Torulène	458 - 484 - 518	3.240	54
3'4'-déhydro-18'-oxo- γ -carotène	(484) - 510 - 542	2.865	54
3'4'-déhydro-18'-hydroxy- γ -carotène	462 - 488 - 519	2.460	54
Torularhodine	(474) - 500 - 533	2.580	33

CHAPITRE II

ETUDE DES PIGMENTS DE RHODOTORULA MUCILAGINOSA

SOUCHE RMP - RO₁ et RJ₁

Les levures cultivées sur un milieu gélosé se colorent intensément et très rapidement. Nous avons entrepris l'étude et l'identification des pigments dans les différentes souches après une croissance de trois à quatre jours à température ambiante, lorsque la coloration est la plus intense. Chaque culture est habituellement réalisée sur cinq boîtes de Roux et le rendement par boîte est de 1 gramme de levure sèche environ.

a) ETUDE DES CAROTENOIDES DE LA SOUCHE RMP

Nous avons pu caractériser la torularhodine. Ce pigment qui a déjà été identifié dans cette levure avait été défini comme un composé monocyclique en C37, possédant 12 doubles liaisons conjuguées et une fonction acide à l'extrémité de la chaîne. En réalité il s'agit d'un pigment monocyclique à fonction acide mais possédant un squelette carboné de 40 carbones et un chromophore de 13 doubles liaisons conjuguées, ce qui fut démontré par sa synthèse totale (28).

Pour séparer les caroténoïdes obtenus en phase éthérée nous procédons à une première chromatographie sur alumine V. Sur cet adsorbant une zone orange correspondant aux caroténoïdes non oxygénés se désorbe rapidement avec l'éther de pétrole contenant 2 % d'éther sulfurique, et il reste sur la colonne une zone violette, surmontée d'une zone rouge. La zone violette s'élue avec 4 % d'éther sulfurique dans l'éther de pétrole ; le pigment correspondant à cette zone se trouve toujours à l'état de traces, aussi est-il très difficile de l'isoler dans cette souche. Ses propriétés chromatographiques, tant sur colonne que sur couche mince, et son spectre d'absorption, laissent penser qu'il s'agit de 3'4'-déhydro-18'-oxo- γ -carotène.

La zone rouge plus fortement adsorbée que la zone violette s'élue avec le mélange éther de pétrole à 10 % d'éther sulfurique. Le spectre d'absorption de ce pigment présente dans l'éther de pétrole des maxima situés à 457 - 484 - 518 m μ . Ces valeurs sont proches de celles du torulène isolé de la levure et de celles trouvées par RUEGG et coll. (54) pour le 3'4'-déhydro-18'-hydroxy- γ -carotène synthétique (alcool en C40).

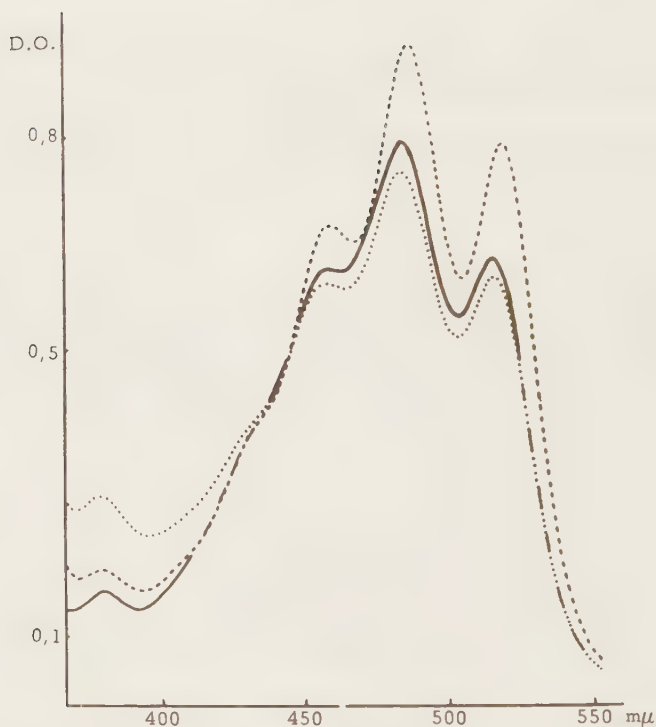


FIGURE 1

3'4'-déhydro-18'-hydroxy- γ -carotène. Spectre dans l'éther de pétrole

- obtenu par réduction de l'ester méthylique de la torularhodine synthétique.
- obtenu par réduction de la torularhodine extraite de la levure.
- extrait de la levure.

Par chromatographie en couche mince sur le mélange Kieselgel G - alumine 2/1 dans le système éther de pétrole - éther sulfurique 4/1, le pigment migre avec un R_f de 0,14 alors que dans les mêmes conditions le torulène migre avec un R_f de 0,85. Chromatographié sur cellulose imprégnée d'huile de paraffine selon la technique de EGGER (14), avec le mélange acétone-méthanol 40/60 v/v, le pigment a un R_f de 0,70 et le torulène, dans ces conditions, ne migre pas.

Afin de vérifier la présence éventuelle d'un groupement époxyde, nous avons traité le pigment par ClH fumant dans l'éther sulfurique ; aucune coloration bleue ne s'est développée, ce qui permet d'exclure ce groupement.

Le pigment après avoir été soumis à l'action de l'hydrure de lithium et l'aluminium conserve ses propriétés chromatographiques et spectroscopiques, ce qui permet d'exclure la présence de groupement carbonyle.

Par action de l'anhydride acétique dans la pyridine anhydre, il s'acétyle très facilement ce qui est en faveur d'un alcool primaire ou secondaire.

Nous avons alors comparé ses propriétés avec celles de l'alcool synthétique obtenu en hydrogénant au moyen de l'hydrure de lithium et d'aluminium l'ester méthylique de la torularhodine (*). Le pigment de la levure et l'alcool synthétique, comme leurs produits d'acétylation respectifs, se sont révélés identiques quant aux propriétés spectroscopiques et chromatographiques.

De même, il ne nous a pas été possible de séparer par chromatographie sur colonne et sur couche mince le mélange du pigment isolé de la levure et de l'alcool obtenu par réduction de la torularhodine, extraite de la levure.

Nous pensons donc qu'il s'agit de 3'4'-déhydro-18'-hydroxy- γ -carotène et c'est la première fois, à notre connaissance que ce pigment est isolé à l'état naturel.

La fraction éluée de la zone orange sur alumine V et contenant les caroténoïdes hydrocarbures est évaporée à sec, reprise par de l'éther de pétrole et chromatographiée sur alumine I et sur magnésie-hyflosupercel. Nous avons pu ainsi séparer puis identifier le phytoène, le phytofluène, le ζ carotène, qui n'avaient pas encore été caractérisés dans cette souche. Le neurosporène et les pigments cycliques β zéacarotène, γ carotène, β carotène et torulène ont été également isolés, ces pigments ayant déjà été caractérisés par divers auteurs dans cette levure.

b) ETUDE DES CAROTENOIDES DU MUTANT RO₁

Cette levure mutante présente une teinte plus orangée que celle de la souche mère. Nous avons pu identifier les mêmes carotènes hydrocarbures que dans la souche RMP ; quant aux caroténoïdes oxygénés, ce mutant ne synthétise pas de torularhodine et l'aspect du chromatogramme sur alumine d'activité V est nettement différent de celui obtenu avec les pigments oxygénés extraits de la levure mère : ainsi par ordre croissant d'adsorption, trois zones peuvent être séparées : une zone jaune **a**, une zone violette **b** et une zone rouge **c**.

(*) Nous tenons à remercier la firme Hoffmann-La Roche, Bâle, qui nous a gracieusement adressé certains échantillons de caroténoïdes synthétiques.

a) La zone jaune s'élue avec 2 à 3 % d'éther sulfurique dans l'éther de pétrole. Par action de l'hydrure de lithium et d'aluminium, nous avons pu constater que certains pigments de cette zone sont réductibles et les produits obtenus, séparés par chromatographie, présentent des spectres qui laissent penser que ce sont des composés à chromophore plus court que les pigments en C40 qui possèdent 11 doubles liaisons conjuguées dans leur molécule. Mais ces pigments trop peu abondants n'ont pu être étudiés, même en opérant sur des masses de levure plus importantes.

b) La zone violette, très importante, s'élue avec 4 à 5 % d'éther sulfurique dans l'éther de pétrole. Le pigment élué présente dans le visible et en solution dans différents solvants, un spectre qui est extrêmement voisin de celui trouvé (dans la littérature) pour le 3'4'-déhydro-18'-oxo- γ -carotène (54). En traitant le composé synthétique par la potasse alcoolique à 10 %, suivi de chromatographie sur alumine V, nous obtenons un dérivé très isomérisé dont le spectre est alors superposable à celui du pigment de la levure.

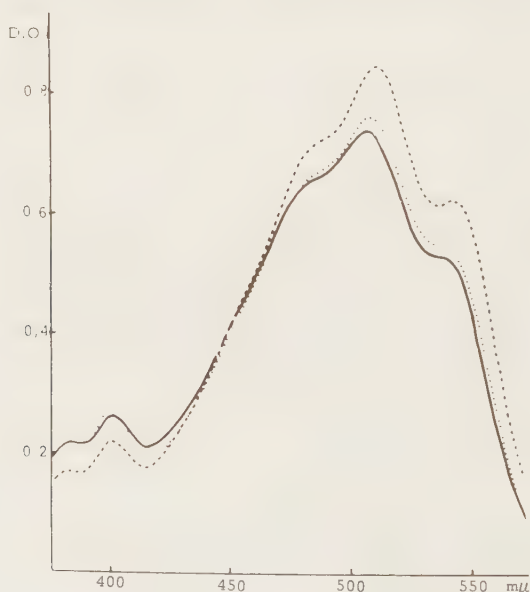


FIGURE 2

3'-4-déhydro-18'-oxo- γ carotène. Spectre dans l'éther de pétrole.

- - - - - synthétique
- synthétique après traitement alcalin et chromatographie sur alumine V
- extrait de la levure

Chromatographié sur couche mince de Kieselgel G - alumine (2/1) dans le système éther de pétrole - éther sulfurique (4/1) le pigment isolé de la levure migre avec un Rf de 0,40, intermédiaire entre celui du torulène (0,85) et celui du 3'-4'-déhydro-18'-hydroxy- γ carotène (0,14). En phase inversée, le torulène ne migre pas, le pigment isolé a un Rf de 0,43 et celui du 3'-4'-déhydro-18'-hydroxy- γ carotène un Rf de 0,71. L'action de l'hydrure de lithium et d'aluminium sur ce pigment conduit à un dérivé qui s'acétyle facilement par l'anhydride acétique dans la pyridine anhydre et correspond donc à un alcool primaire ou secondaire. D'autre part, par rapport au spectre du pigment initial, le spectre de cet alcool se trouve déplacé de 22 $m\mu$ vers les courtes longueurs d'onde, ce qui est en bon accord avec la présence, avant réduction, d'un groupement carbonyle, aldéhyde ou cétone.

Par action du chlorhydrate d'hydroxylamine à 60° dans la pyridine et sous azote, nous avons pu caractériser la formation d'une oxime.

Pour savoir s'il s'agit d'une fonction aldéhydique ou cétonique, nous avons suivi la cinétique de réduction de notre pigment par le borohydrure de sodium dans différents solvants selon la technique proposée par BROWN (7). Dans l'alcool absolu, la réduction est obtenue en 8 minutes, dans le diéthylène-glycol diméthyléther (Diglyme) en 30 minutes et dans l'alcool isopropylique en 75 minutes ; ces durées de réduction impliquent que le groupement carbonyle est de nature aldéhydique.

En outre nous avons tenté la condensation avec l'acétone en milieu alcalin. Après purification nous avons isolé un dérivé dont le spectre dans le visible montre, comme ce serait le cas pour un aldéhyde (65) une extension du chromophore correspondant à une double liaison conjuguée supplémentaire. Il nous apparaissait donc que le pigment isolé était un caroténoïde aldéhydique. L'identité de cet aldéhyde avec le 3'-4'-déhydro-17'-oxo- γ -carotène synthétique a pu être prouvée par comparaison spectroscopique et chromatographique, soit des deux pigments, soit de leurs dérivés préparés dans les mêmes conditions. Nous n'avons pas constaté de différence entre les deux aldéhydes.

Comparaison de l'aldéhyde isolé
et du 3', 4'-déhydro-17'-oxo- γ -carotène synthétique

Maximums d'absorption ($m\mu$)

Dérivé	Aldéhyde isolé	Aldéhyde synthétique
.....	400-(484)-510-542	400-(483)-510-542
Oxime	393-(470)-498-530	393-(470)-498-530
Alcool	378- 460 -485-520	380- 460 -487-520
Dérivé de condensation avec l'acétone	410-(482)-512-545	410-(485)-510-545

c) La troisième zone rouge s'élue avec de l'éther sulfurique à 10-12 % dans l'éther de pétrole. Le spectre du pigment recueilli indique que le composé est impur. Une seconde chromatographie sur alumine d'activité V permet de séparer deux pigments dont le plus abondant présente un spectre d'absorption identique à celui de β -apo-2'-caroténol. Suivant les techniques déjà décrites pour l'alcool en C40, nous avons vérifié l'absence des groupements époxyde et carbonyle et nous avons constaté que le produit s'acétyle facilement. Par chromatographie sur colonne de cellulose ou de saccharose le pigment présente un comportement identique à celui du β -apo-2'-caroténol synthétique. C'est la première fois, à notre connaissance, que ce caroténoïde est isolé à l'état naturel.

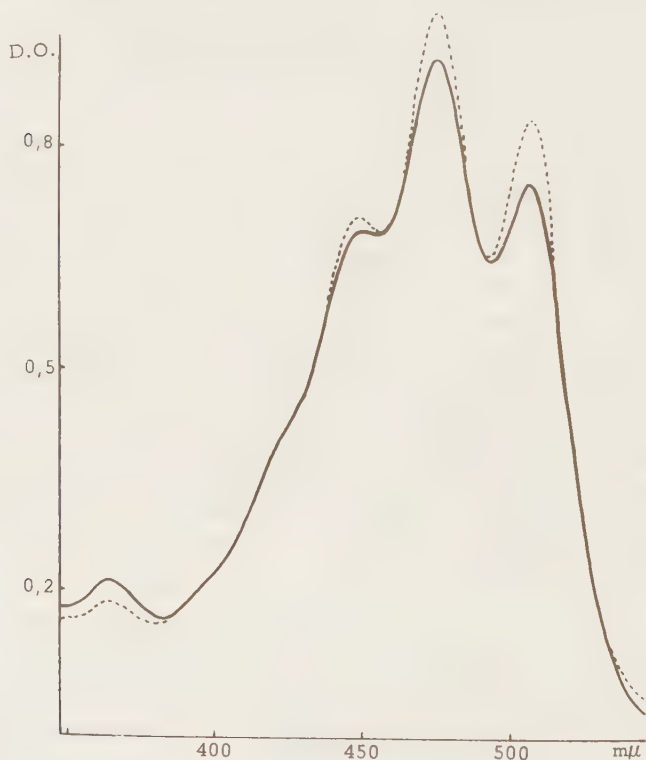


FIGURE 3

β -apo-2'-caroténol. Spectre dans l'éther de pétrole

----- synthétique
 ———— extrait de la levure

c) ETUDE DES CAROTENOIDES DU MUTANT RJ₁

Cette souche présente une coloration jaune qui la différencie nettement de la souche mère. Nous avons pu isoler de ce mutant le phytoène, le phytofluène, le ζ carotène, le neurosporène ainsi que le β zéacarotène, le γ carotène, le β carotène et la torularhodine, mais nous n'avons pas réussi à caractériser le torulène. A priori cette absence de torulène pouvait être attribuée à une teneur très faible dans les cellules, cependant en traitant une masse de cellules correspondant à plus de 50 g de levure sèche et que nous avons obtenue en cultivant la levure sur 50 à 60 boîtes de Roux, nous n'avons pas davantage réussi à déceler le torulène.

La chromatographie sur alumine V nous a permis de constater la présence de caroténoïdes oxygénés. Nous avons en effet pu séparer des zones jaunes et violettes mais la faible teneur en pigments, même lors de l'extraction de masse importante de levure ne nous a pas permis leur identification.

CHAPITRE III

INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LA PIGMENTATION

L'étude de la caroténogénèse chez les végétaux supérieurs, comme chez les microorganismes a révélé que différents facteurs peuvent intervenir dans la biosynthèse des pigments. D'une part de nombreux travaux ont démontré que l'illumination peut accroître ou induire la synthèse des caroténoïdes chez tous les organismes photosynthétiques, et chez certaines bactéries photochromogènes. D'autre part on constate également que l'oxygénation, non seulement est nécessaire à la formation des caroténoïdes, mais peut également intervenir sur la concentration des pigments chez des microorganismes aérobies (5). Notons au passage que bon nombre de bactéries anaérobies (42) synthétisent aussi des caroténoïdes.

Enfin comme toutes les réactions chimiques, la biosynthèse des caroténoïdes est influencée par les variations de température.

Nous avons donc jugé utile d'étudier l'influence de ces facteurs sur la caroténogénèse chez *Rhodotorula*.

a) INFLUENCE DE LA LUMIERE SUR LA PIGMENTATION DE *RH. MUCILAGINOSA*

Chez un microorganisme non photosynthétique, *Neurospora crassa*, GROB (26) et ZALOKAR (70) ont montré que la lumière était indispensable au développement d'une forte pigmentation. A l'obscurité le champignon ne synthétise que des traces de carotènes (phytofluène, ζ carotène) mais exposé à la lumière le mycelium se colore très rapidement. Pour vérifier une éventuelle influence de la lumière sur la caroténogénèse chez *Rh. mucilaginosa*, nous l'avons cultivée tantôt sous un éclairage constant, tantôt à l'obscurité, et tantôt en alternant les deux, ce dernier cas correspondant aux conditions habituelles de culture. Nous n'avons pas constaté de modification ni des taux ni de la composition des caroténoïdes. Mais comme l'a montré GOODWIN, chez *Chlorella vulgaris* (21), la présence de sources carbonées sous forme de glucides et la présence de source azotée sous forme de sel d'ammonium permettent la caroténogénèse même à l'obscurité. Aussi pour éliminer cette éventuelle intervention des sources nutritives dans la formation d'une part des caroténoïdes et d'autre part des enzymes responsables de la synthèse de ces pigments, nous avons opéré de la façon suivante : *Rhodotorula mucilaginosa* est d'abord cultivée en présence de 2-hydroxybiphényle qui inhibe la pigmentation (63). L'inhibiteur est ensuite éliminé puis les levures soigneusement lavées sont placées dans un tampon phosphate à l'obscurité et soumises à une aération de 11/mn. Au bout de

48 heures les levures sont colorées et la composition en pigments est identique à celle des levures témoins. Cette indifférence à la lumière de *Rh. mucilaginosa* peut encore s'expliquer par un phénomène identique à celui décrit par ZALOKAR chez *Neurospora crassa* (69) : lorsque des cultures peu colorées, obtenues après croissance à l'obscurité, sont exposées à la lumière pendant une minute, une pigmentation se développe rapidement même si les cellules sont replacées à l'obscurité. Par ailleurs RILLING (53) a montré que chez une espèce de *Mycobacterium photochromogène*, la lumière et l'oxygène semblent induire la formation des enzymes contrôlant la biosynthèse des caroténoïdes. Cette bactérie n'exige pas une illumination continue, mais la quantité d'enzymes formée, et donc la quantité de pigments postérieurement synthétisée est fonction de la durée d'éclairement.

Pour mettre en évidence un rôle inducteur de la lumière sur la caroténogénèse de *Rhodotorula mucilaginosa*, la méthode la plus simple est de vérifier si par des cultures répétées, à l'obscurité totale, la levure se pigmente.

Pendant six semaines, trois cultures de la souche RMP ont été réalisées sur milieu gélosé, à l'obscurité et à température ambiante. Les repiquages étant faits tous les quatre jours et sous lumière rouge, aucune culture n'a présenté une pigmentation différente de celle des cultures réalisées en parallèle et exposées à la lumière.

Il semble en conséquence, que chez *Rh. mucilaginosa*, la lumière n'induit pas la caroténogénèse, et qu'elle ne provoque aucune modification qualitative et quantitative des pigments. Des expériences identiques réalisées avec *Rh. aurantiaca* ont conduit au même résultat.

b) INFLUENCE DU MODE DE CULTURE

A notre connaissance aucun travail ne relate de modification de la pigmentation suivant le mode de culture sur un milieu nutritif identique. Nous avons constaté, qu'en milieu liquide, les trois souches de levures présentent une intensité de coloration très différente de celle obtenue sur milieu solide après un temps de culture identique.

Nous avons donc entrepris une étude comparative de la composition en caroténoïdes des levures, les résultats des dosages des pigments sont reportés dans le tableau III.

L'examen des résultats fait apparaître que les modifications de la pigmentation observées entre les cultures effectuées sur milieu solide et sur milieu liquide, sont dues à des différences de la teneur en pigments cycliques et acycliques.

TABLEAU III

Comparaison de la composition en caroténoïdes chez *Rh. mucilaginosus* et *Rh. aurantiaca* cultivées sur milieu solide et milieu liquide. Résultats exprimés en $\mu\text{g/g}$ m.s.

Les cultures ont été effectuées à température ambiante, en milieu liquide l'aération est de 11/m par litre de milieu.

Souche	RMP		RO ₁		RJ ₁		Rh. aurantiaca C.B.S. 2200	
	solide	liquide	solide	liquide	solide	liquide	solide	liquide
Phytoène	51,6	122	61,5	130	50	83	70,3	140
Phytofluène	1,8	5,4	1,4	5,7	traces	7,1	2,3	8,5
ζ carotène	2	7	0,46	7,6	6,3	14,5	1,8	8,5
Neurosporène	0,8	6	5,2	9,3	5,2	15,2	1	11,5
Lycopène	0	0	0	1	0	4,3	0	0
β zéacarotène	5	6	traces	4,6	traces	4,6	2,8	20
γ carotène	2	8,7	6,5	20	41,4	75	5,3	20
β carotène	13,5	35	53,5	41	40	38	51,9	70
Torulène	9,6	7	11,6	7	0	0	20,5	11,5
Alcool C40	traces	0	traces	12	0	0	traces	0
Aldéhyde C40	traces	0	6	5,6	0	0	traces	0
Torularhodine	120	48	0	0	4,8	7,1	101	21

Parmi les caroténoïdes cycliques, nous observons en milieu liquide dans la souche mère, une baisse de la formation de la torularhodine, tandis que celle de γ et β carotène est augmentée. Dans le mutant RO₁, il est intéressant de noter une augmentation des taux de β zéacarotène, du γ carotène et de l'alcool en C40 alors que dans la souche RJ₁, la synthèse du β zéacarotène, du γ carotène comme celle de la torularhodine est accrue.

Quant aux carotènes acycliques, ils voient leur taux augmenté dans les trois souches, ainsi la quantité du phytoène double en milieu liquide, celle des autres polyènes acycliques est globalement triplée ; en outre dans les deux mutants RO₁ et RJ₁, il est possible, en milieu liquide, de déceler la présence d'un pigment qui dans l'éther de pétrole, le benzène et le sulfure de carbone a un spectre d'absorption semblable à celui du lycopène, ce qui laisse supposer un chromophore à onze doubles liaisons conjuguées. Vu l'importance que peut avoir ce pigment s'il s'agit de lycopène, en tant qu'intermédiaire dans un processus de filiation, nous avons vérifié son identité de la manière suivante. La présence d'un cycle dans la molécule ne pouvant pas être exclue, nous avons déterminé la structure acyclique du pigment en comparant son comportement chromatographique en phase gazeuse avec celui de caroténoïdes acyclique, mono et bicyclique. Pour ce faire nous avons hydrogéné en présence de platine d'Adams le pigment extrait de la levure, du lycopène synthétique (acyclique), du torulène (monocyclique) et du β carotène (bicyclique), puis nous avons chromatographié les dérivés obtenus. Le temps de rétention du pigment hydrogéné extrait de la levure est identique à celui du lycopène hydrogéné mais différent de ceux du torulène et du β carotène hydrogénés. En mélange à parties égales, les produits d'hydrogénation du pigment de la levure et du lycopène synthétique n'ont pu être séparés.

Enfin, en appliquant la technique décrite par JENSEN (29), nous avons confirmé son identité avec le lycopène en comparant les produits d'isomérisation à ceux du lycopène extrait de la tomate. L'isomérisation par l'iode a été faite selon la méthode de ZEICHMEISTER (72), et les produits d'isomérisation ont été séparés par chromatographie sur le mélange chaux hydratée-hyflo-supercel. Les produits recueillis se sont révélés identiques pour les deux pigments.

Nous pensons donc qu'il s'agit bien du lycopène que synthétisent les mutants RO₁ et RJ₁ au cours de la croissance en milieu liquide.

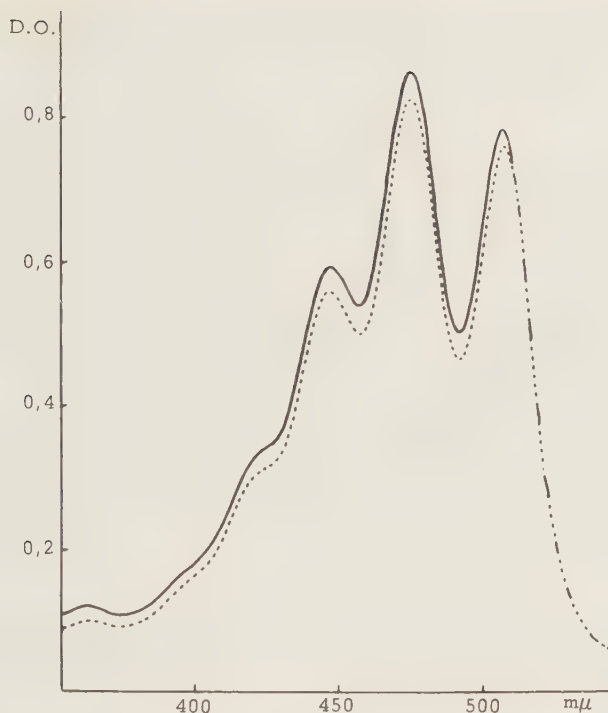


FIGURE 4

Lycopène. Spectre dans l'éther de pétrole

----- extrait de la tomate
 ————— extrait de la levure

Le mode de culture entraînant des variations aussi marquées de la teneur en caroténoïdes au sein d'une même espèce, nous avons été amenés à vérifier sur une espèce différente cette influence du mode de culture. Les dosages des pigments obtenus avec *Rh. aurantiaca* confirment les faits observés avec *Rh. mucilaginosa* (voir tableau n° III, page 23).

Mais nous avons voulu savoir à quel facteur il fallait attribuer ces variations et en particulier la baisse du taux de la torularhodine, que nous constatons en milieu liquide chez *Rh. mucilaginosa* RMP et *Rh. aurantiaca* CBS 2200. Les sources nutritives étant les mêmes, nous avons pensé qu'une déficience de l'aération pouvait être à l'origine de cette baisse en milieu

liquide. Les recherches de SIMPSON (57) ont en effet montré que chez Rh. glutinis l'un des atomes d'oxygène du carboxyle de la torularhodine provenait de l'air, et récemment BOBKOVA (5) a noté l'influence de l'aération sur la caroténogénèse des levures.

Nos cultures sont réalisées habituellement à la température ambiante, et en milieu liquide, l'aération est assurée par un barbotage d'air stérile à raison de 1 litre à la minute pour 800 ml de milieu. En portant ce débit à 4 litres, la coloration des levures n'est pas modifiée et l'étude des pigments nous a permis de discerner uniquement une baisse de 30 % de la concentration du phytoène, les taux de γ carotène, torulène et torularhodine n'étant que faiblement augmentés. Comme dans nos conditions opératoires l'aération n'exerce qu'une influence peu marquée, nous avons alors pensé que les variations de la composition en caroténoïdes selon le mode de culture peuvent être dues au fait que les cellules, qui se développent sur milieu solide, se trouvent très rapidement au cours de leur croissance en présence de concentrations de saccharose plus faibles qu'en milieu liquide. C'est pourquoi nous avons étudié en milieu liquide l'influence de la concentration en saccharose sur la biosynthèse des caroténoïdes. Les résultats de cette expérience réalisée sur la souche RMP sont mentionnés dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Influence de la concentration en saccharose sur la pigmentation de *Rhodotorula mucilaginosa* cultivée en milieu liquide, 800 ml (température ambiante, aération 1l/mn, résultats en $\mu\text{g/g m.s.}$)

Concentration en saccharose			
	5 g/l	20 g/l	45 g/l
Phytoène	50	122	157
Phytofluène	1,3	5,4	6,5
ζ carotène	traces	7	7,3
Neurosporène	2	6	4,7
Lycopène	0	0	0
β zéacarotène	3,5	6	3,7
γ carotène	0	8,7	12,1
β carotène	44	35	37
Torulène	38	7	17
Torularhodine	130	48	37
TOTAL	274,8	245,1	282,3

m De ce tableau il ressort clairement que les fortes concentrations de saccharose diminuent la formation de la torularhodine et du torulène, mais produisent une nette augmentation des taux des carotènes acycliques et particulièrement celui du phytoène.

c) INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

On sait depuis longtemps que des tomates ne rougissent pas à 30° alors qu'à 19° elles se colorent intensément par production à cette température de fortes quantités de lycopène ; la synthèse de β carotène n'est pas influencée par la température (66).

Chez *Rh. glutinis* (58) et chez *Rh. rubra* (41), le β carotène représente le pigment principal lorsque les levures sont cultivées à 5°, alors que le torulène et la torularhodine prédominent lorsque les cultures sont réalisées à 25°. Ces résultats nous ont incité à déterminer l'influence de la température sur la caroténogénèse de nos souches. Pour obtenir des résultats reproductibles, sans trop perturber la croissance, nous avons réalisé nos expériences à 15°, 22° et 30° car au-delà de ces limites *Rh. mucilaginis* ne se développe que très faiblement.

Les résultats rapportés dans le tableau V montrent une diminution importante de la teneur globale en caroténoïdes lorsque les levures sont cultivées à 15° C. Il en est de même mais à un degré moindre pour les cultures réalisées à 30° C. On constate de plus que l'élévation de la température de culture stimule la production du torulène dans la souche mère et dans le mutant RO₁.

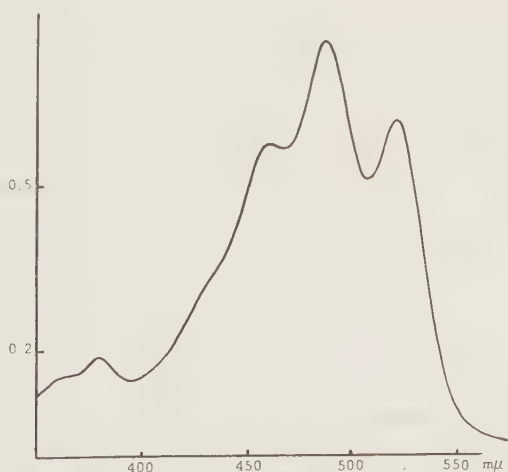


FIGURE 5

Torulène. Spectre dans l'éther de pétrole.

TABLEAU V

Influence de la température sur la teneur en caroténoïdes de *Rh. mucilaginos*a (RMP, RO₁ et RJ₁)
cultivée en milieu liquide pendant 3 jours, aération 1l/m pour 800 ml de milieu.
Les résultats sont exprimés en µg/g m.s.

	RMP culture à			RJ ₁ culture à			RO ₁ culture à		
	15°	22°	30°	15°	22°	30°	15°	22°	30°
Phytoène	88	122	96	73,3	83	73,5	107,9	130	98
Phytofluène	3,7	5,4	4,5	8,7	7,1	4,3	4,6	5,7	2,3
ζ carotène	3,9	7	4	16,5	14,5	9,2	4	7,6	3,6
Neurosporeène	3,5	6	2,7	8,5	15,2	7,9	5	9,3	1,7
Lycopène	0	0	0	0	4,3	1,2	0	1	0
β zéacarotène	3,8	6	3,2	0	4,6	3	0	4,6	traces
γ carotène	4,3	8,7	3,7	24	75	55	14,5	20	5,4
β carotène	20	35	25	24	38	65,5	14,7	41	24
Torulène	6	7	18,2	0	0	3,5	8,6	7	35
Torularhodine	17,4	48	35	traces	7,1	9,4	0	0	0
TOTAL	150,6	245,1	192,3	155,0	248,8	232,5	159,3	226,2	170,0

Dans le mutant RJ₁ apparait en faible quantité un composé dont le spectre d'absorption présente des maximums à 460-485 et 518 m μ dans l'éther de pétrole. Des cultures de cette souche réalisées à 30° et sur de grands volumes, nous ont permis d'identifier ce pigment au torulène.

Quant à la synthèse de la torularhodine, aucune différence notable n'apparaît entre les cultures effectuées à 30° et à température ambiante. Mais au paragraphe précédent nous avons signalé l'importance de la concentration en saccharose ; en réalisant les cultures à 30° et en modifiant les concentrations de saccharose du milieu il se confirme, comme le montre le tableau VI, que cet élément carboné intervient dans la formation de la torularhodine, la température étant sans influence.

TABLEAU VI

Rhodotorula mucilaginosa, souche RMP

Taux de torularhodine en fonction de la concentration de saccharose dans le milieu de culture (aération 1l/m pour 800 ml de milieu). Résultats en $\mu\text{g/g}$ levure sèche.

Taux de saccharose ‰	5	20	45
A température ambiante	130	40	37
A température de 30°	155	35	40

Les relations entre la croissance et la pigmentation des cellules sont pour l'instant encore difficiles à préciser. Or les variations de température ne sont pas sans influencer la croissance ; nous observons habituellement une baisse de l'ordre de 20 à 40 % de matière sèche lorsque la culture est réalisée à 30°, quelle que soit la concentration en saccharose dans le milieu. Pour préciser l'influence du facteur température sur la caroténogénèse, nous avons réalisé une expérimentation sur des cellules non proliférantes : les levures sont cultivées à 15°, récoltées, lavées puis mises en tampon phosphate sans source carbonée ni azotée, l'aération est poursuivie soit à 15° soit à 30°.

Les résultats obtenus dans ces conditions sont rapportés dans le tableau VII.

En suspension dans le tampon phosphate, nous constatons pour la souche RMP une baisse du taux des polyènes acycliques quelle que soit la température, et cette baisse est accompagnée d'une augmentation globale du taux des pigments cycliques. Pour ces derniers nous observons des différences importantes entre les résultats obtenus à 15° et ceux obtenus à 30°. Ainsi le γ carotène augmente seulement dans les cellules maintenues à 15° ;

TABLEAU VII

Cellules non proliférantes : variation de la teneur en caroténoïdes sous l'influence de la température.
Résultats exprimés en $\mu\text{g/g m.s.}$

	Souche RMP cultivée 3 jours à 15°		Souche RJ ₁ cultivée 3 jours à 15°		
	Incubation en tampon phosphate Temps Oh. Après 12 h. d'aération à		Incubation en tampon phosphate Temps Oh. Après 24 h. d'aération à		
	15°	30°	15°	30°	
Phytoène	92	57,2	traces	50	20
Phytofluène	2,4	1,5	0	7	2
ζ carotène	4,5	2	0	10,5	2,8
Neurosporène	2	1,5	2	7	3,7
Lycopène	0	0	traces	traces	4,3
β zéacarotène	traces	traces	traces	traces	traces
γ carotène	3,5	14,4	5	10,8	51
β carotène	12	15	40,5	14	27,2
Torulène	traces	17	83	0	0
Torularhodine	20	24	50	traces	6,7
					7,7

le β carotène comme la torularhodine restent pratiquement constants à cette température et ne voient leur taux s'accroître qu'à une température plus élevée. Quant à la teneur du torulène, elle augmente dans les deux cas mais de façon beaucoup plus sensible à 30° C.

Des résultats semblables s'observent dans la souche mutante RJ₁. dans celle-ci, à 15°, il faut noter une apparition du lycopène et une très importante accumulation du γ carotène ; nous avons pu constater que sa teneur reste relativement élevée et stable pendant plus de 48 heures, le torulène alors n'apparaît pas, le β carotène augmente dans les deux cas mais très fortement à 30° et il est intéressant de noter que cette augmentation du β carotène, comme l'apparition du torulène (à 30°), est concomitante d'une faible teneur en γ carotène.

Ces résultats, qui laissent entrevoir une transformation du γ carotène en β carotène d'une part, et en torulène d'autre part, ont été obtenus sur des suspensions de cellules placées les unes à 15°, les autres à 30°. Nous avons pu confirmer ces résultats, comme le montre la figure 6, sur des levures d'abord cultivées à 15° puis aérées en tampon phosphate successivement à 15° puis à 30°.

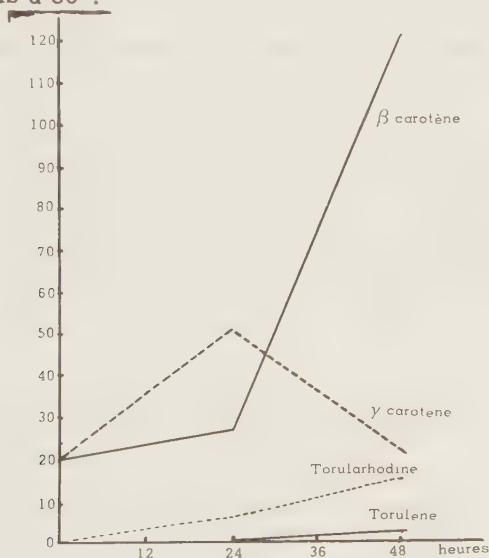


FIGURE 6

Mutant RJ₁

Variation, en tampon phosphate, des taux des pigments cycliques.

- de 0 à 24 h. : tampon phosphate à 15°
- de 24 à 48 h. : tampon phosphate à 30°

En résumé : les conditions de culture des microorganismes ont une influence sur la caroténogénèse. C'est ainsi que nous avons pu mettre en évidence d'une part une variation importante des teneurs en caroténoïdes dans les levures et d'autre part une synthèse du lycopène par des souches qui, jusqu'alors, avaient été considérées comme incapables d'en produire.

Nous avons constaté que la lumière n'intervient pas sur la caroténogénèse des levures *Rh. mucilaginosa* et *Rh. aurantiaca*.

Quant à l'influence de l'aération des cellules, dans nos conditions habituelles de culture à température ambiante, nous avons observé qu'elle est minime et se manifeste surtout sur la quantité du phytoène et de la torularhodine.

Une forte concentration de saccharose agit sur la synthèse des caroténoïdes en augmentant le taux de phytoène et en réduisant en particulier celui du torulène et de la torularhodine.

Enfin la température a une action manifeste sur la teneur en caroténoïdes des levures ; en la faisant varier nous avons pu nous rendre compte, d'une part que, l'augmentation des caroténoïdes cycliques semble liée à la baisse des pigments acycliques, et d'autre part que le γ carotène peut jouer un rôle d'intermédiaire dans la biosynthèse des pigments cycliques..

CHAPITRE IV

ACTION DE DIFFERENTS AGENTS CHIMIQUES SUR LA CAROTENOGENESE

L'étude des mutants des levures nous a permis de constater l'apparition ou l'accumulation de certains carotènes, mais dans ce cas les perturbations observées ne sont pas prévisibles ; les mutations étant le fait du hasard et de plus nous ne pouvons pas éliminer l'hypothèse d'une déviation métabolique. Aussi avons-nous tenté de provoquer des inhibitions à des stades définis de la synthèse des caroténoïdes en utilisant des substances telles que la β ionone, l'acide déhydroacétique ou encore un dérivé du biphényle. Nous avons choisi ces substances parce que leur action a déjà été éprouvée chez d'autres microorganismes.

a) ACTION DE LA β IONONE, DE LA METHYLHEPTENONE ET DE LA BENZOPHENONE SUR RHODOTORULA MUCILAGINOSA

MACKINNEY et coll. (38) ont montré que l'addition de β ionone au milieu de culture provoque chez *Phycomyces blakesleanus* une augmentation de la teneur en β carotène, tandis que la méthylhépténone en inhibe la synthèse tout en stimulant celle du phytoène. De plus les résultats obtenus avec des mélanges de β ionone et de méthylhépténone montrent que ces deux cétones agissent de façon indépendante sur la synthèse des caroténoïdes (39). Il faut remarquer que les expériences mettant en œuvre de la β ionone radioactive révèlent qu'elle n'est pas incorporée dans la molécule de β carotène. Le mécanisme, par lequel la β ionone intervient, ne semble pas dû à une induction d'un système enzymatique qui provoque une synthèse exagérée de β carotène. Selon REYES et coll. (52) la β ionone empêche un rétro-contrôle exercé par les caroténoïdes au niveau de l'acide mévalonique.

Au contraire chez *Rh. glutinis*, SIMPSON et coll. (58) ont mis en évidence une action inhibitrice sur la biosynthèse du β carotène, du torulène et de la torularhodine par la β ionone lorsqu'elle est ajoutée aux cultures sous forme de vapeur. En la faisant agir de cette façon, la β ionone n'a manifesté aucun effet sur la croissance ou la pigmentation de *Rh. mucilaginosa*, contrairement à ce qui est observé chez *Rh. glutinis*.

Introduite directement dans le milieu sous forme de solution alcoolique, la β ionone à la concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$ inhibe le développement de *Rh. mucilaginosa* ; cependant la croissance est suffisante pour qu'après quatre jours de culture la quantité de levure récoltée permette le dosage des caroténoïdes. Les résultats montrent que cette cétone inhibe fortement, non

Rhodotorula mucilaginosa. Culture de 3 jours.
 Décoloration des levures sous l'action de la β ionone (60 mg pour 1 g. de matière sèche de levure).

TABLEAU VIII

	Expérience I			Expérience II		
	0 h.	5 h.	29 h.	0 h.	5 h.	29 h.
Phytoène	106	99,5	85	120	130	130
Phytofluène	6,4	2,5	-	5	traces	traces
ζ carotène	6,2	5,6	traces	6,2	5,4	traces
Neurosporène	3,1	2,6	traces	3	2	traces
β zéacarotène	traces	-	-	2,7	2,2	-
β carotène	25,3	17,9	2,7	32	21,3	traces
γ carotène	9,4	6,4	1,3	7,6	6,5	traces
Torulène	12,5	8,4	traces	16	10	traces
Torulathodine	85	51	21	40	30	7,6
TOTAL	253,9	193,9	110,0	212,5	177,4	137,6

seulement la formation de la torularhodine, mais également celle du β carotène et du β zéacarotène. Il semble donc qu'il y ait une diminution de la synthèse des pigments cycliques mais nous n'observons pas d'accumulation des polyènes acycliques.

Cette observation nous a conduit à envisager non plus une inhibition de la formation des caroténoïdes mais la possibilité de leur destruction. Afin de vérifier cette éventualité, nous avons ajouté la β ionone à des cultures âgées de 3 jours, et nous avons chaque fois constaté une décoloration de la masse cellulaire (voir tableau VIII).

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par UEHLKE et DEKER chez *Rh. rubra* (61). Ces auteurs ont montré que la décoloration des levures en présence de β ionone est également due à une destruction des pigments. Parmi-ceux-ci, la torularhodine est détruite le plus rapidement.

Pour éliminer une intervention éventuelle des éléments du milieu de culture dans le mode d'action de la β ionone, nous avons testé l'action de cette cétone en l'absence de source carbonée et azotée. Nous avons constaté que trois facteurs favorisent son action, le pH du milieu, la lumière et l'aération des cellules.

- Ainsi en ajoutant la β ionone dans une suspension de cellules à pH 2,5, 4 et 8, c'est à pH acide que son action est la plus puissante : en effet la décoloration des cellules est 10 fois plus rapide à pH 2,5 qu'à pH 8.

- La lumière (lampe Orsamfluor, type lumière du jour, placée à 40 cm des cultures) active cette décoloration : à pH 2,5 il faut 7 à 8 heures pour que la décoloration soit complète, il en faut 24 pour noter une décoloration partielle à l'obscurité.

- L'aération est également indispensable car, sous azote, en présence de β ionone, les cellules ne se décolorent que faiblement à pH 2,5 et à la lumière, tandis qu'à l'obscurité nous n'observons aucune décoloration au bout de 24 heures.

Nous avons également testé l'action d'un certain nombre de composés cétoniques, dont quelques uns ont été proposés comme des inhibiteurs de la caroténogénèse chez des microorganismes.

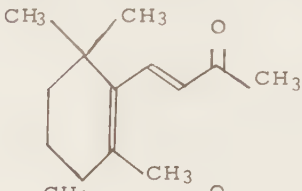
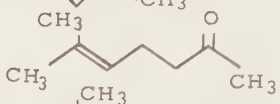
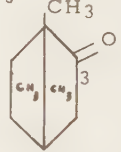
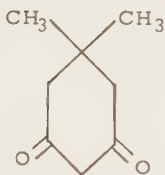
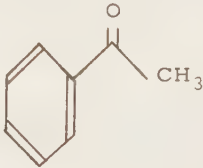
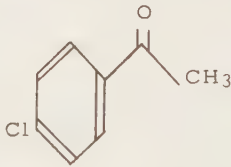
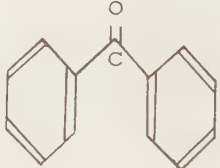
Les résultats, que nous avons observés à pH 2,5 sous éclairage et aération des cellules, sont résumés dans le tableau IX. Une décoloration complète en 6 à 7 heures est exprimée par +++++

Il apparaît clairement que les dérivés, qui se révèlent les plus actifs, ont dans leur molécule une fonction cétone possédant en α un système de doubles liaisons ou un noyau aromatique.

Un processus enzymatique pouvait également intervenir dans le mode d'action de ces substances, aussi avons-nous réalisé avec la β ionone des essais sur des levures tuées par chauffage à 100° pendant trente secondes.

TABLEAU IX

Action sur les caroténoïdes de divers dérivés cétoniques

Dérivés	Formules	PM	Intensité de la décoloration
β ionone		192	+++++
Méthylhépténone		126	+
Camphre		152	$\pm$
Dimédon (5-5 diméthyl 1-3 cyclohexandione)		140	$\pm$
Acétophénone (méthylphénylcétone)		120	++++
Chloracétophénone		154	++++
Benzophénone		182	+++++

Les cellules mortes exposées à la lumière et soumises à l'aération perdent lentement leur pigmentation et il faut attendre 24 heures pour obtenir une décoloration complète ; en présence de β ionone, elles sont blanches en une à deux heures. De plus nous avons réussi à détruire des caroténoïdes en solution alcoolique en présence de β ionone, acétophénone et benzophénone in vitro, dans les mêmes conditions d'éclairage et d'aération que celles utilisées pour les cellules. Or l'acétophénone et la benzophénone provoquent la rupture de liaisons éthyléniques dans un processus photochimique (8) ; aussi n'est-il pas impensable que ce soit de cette manière que se détruisent les pigments au sein même des cellules. C'est pourquoi nous considérons qu'il faut attribuer à tous ces dérivés cétoniques non pas un rôle d'inhibiteur au sens biochimique, mais plutôt un rôle de médiateur d'une photooxydation des carotènes.

Nous avons également essayé la β ionone sur les mutants RO₁ et RJ₁ de *Rhodotorula mucilaginosa*. Nous avons invariablement observé la décoloration des cellules, mais comparé à la souche mère, le mutant RO₁ se décolore plus rapidement tandis que le mutant RJ₁ se montre moins sensible et ne se décolore jamais complètement. Pour expliquer cette différence d'action de la β ionone, nous pouvons supposer une perméabilité différente des membranes cellulaires à l'égard de ce produit.

b) ACTION DE L'ACIDE DEHYDROACETIQUE SUR LA CAROTÉNOGENESE

La présence du groupement carboxyle dans la torularhodine pourrait provenir de l'oxydation d'un des méthyles du groupement gème diméthyle du torulène. Chez un microorganisme un exemple d'une telle oxydation de méthyle en carboxyle nous est donné au cours de la biosynthèse de la patuline par *Penicillium patulum* ; dans ce cas BASSELL et coll. (3) ont montré que l'acide déhydroacétique inhibait cette réaction. C'est pourquoi nous pouvions espérer à l'aide de cet acide bloquer plus spécialement la synthèse de la torularhodine et observer alors une accumulation de torulène.

Mais cet acide possède une puissante action bactéricide et fongicide par inhibition des phénomènes respiratoires des microorganismes. Aussi pour nos expériences avons-nous dû utiliser une concentration réduite à 10 μ g/ml. Après 3 jours de culture nous obtenons une masse de cellules suffisante mais présentant une pigmentation plus intense que celle des levures témoins. Nous avons effectué le dosage des caroténoïdes et les résultats sont reportés dans le tableau X.

Nous constatons qu'en présence d'acide déhydroacétique le taux de phytoène, sauf chez le mutant RJ₁, est inférieur à celui des levures témoins. Au contraire le taux de torularhodine comme celui du β carotène augmente dans les levures RMP, RJ₁ et *Rh. aurantiaca*. Dans le mutant RO₁ qui ne synthétise pas de torularhodine, il faut noter une nette augmentation du torulène et de l'aldéhyde en C40.

TABLEAU X

Teneur en caroténoïdes des levures Rh. mucilaginoso et Rh. aurantiaca après 3 jours de culture en présence de 10 µg/ml d'acide déhydroacétique.

	RMP		RJ ₁		RO ₁		Rh. aurantiaca	
	Témoin	Ac. déhydroacétique	Témoin	Ac. déhydroacétique	Témoin	Ac. déhydroacétique	Rh. aurantiaca 2200	Ac. déhydroacétique
Phytoène	160	130	83	86	124	24	140	60
Phytofluène	5,6	4,7	7,1	6,7	5,9	0,7	8,5	2,6
ζ carotène	9	4,5	14,5	11	7,7	1,3	8,5	4,2
Neurosporiène	4,3	4,6	15,2	15	9,6	1,6	11,4	6,4
β zéacarotène	7,5	7,6	4,6	4,7	5,7	traces	20	5,7
Lycopène	0	0	4,3	0	1,5	0	0	0
γ carotène	3,5	5,6	75	73	26,8	39	20	40,5
β carotène	29	39	38	55	34,7	38	70	100
Torulène	2	16	0	0	5,7	56	11,5	7,3
Alcool C40	0	traces	0	0	traces	traces	0	traces
Aldéhyde C40	0	traces	0	0	5,5	21,1	0	traces
Torulanhodine	36	58	7,1	10,5	0	0	21	82

Il apparait donc évident que l'acide déhydroacétique agit sur la caroténogénèse, mais nous ne pouvons pas retenir l'idée d'une inhibition de la transformation du torulène en torularhodine comme nous l'escomptions.

c) ACTION DU 2-HYDROXYBIPHENYLE

Le biphényle et certains de ses dérivés tel que le 2-hydroxybiphényle ont déjà été utilisés en tant qu'inhibiteurs de la caroténogénèse chez *Rhodotorula mucilaginosa* (64). Ce rôle est constaté par des expériences réalisées sur *Phycomyces* et certaines bactéries (53).

A des doses supérieures à 50 $\mu\text{g/ml}$ la croissance des trois souches de *Rh. mucilaginosa* est très faible, voire nulle ; à une dose de 40 $\mu\text{g/ml}$ en milieu liquide ou gélosé, le taux de croissance est inférieur de 30 % environ au taux normal, et les cellules récoltées au bout de 4 jours de culture ne sont pas pigmentées. Chez *Rh. aurantiaca*, l'action du 2-hydroxybiphényle sur la caroténogénèse se confirme ; cette levure est toutefois plus sensible à ce produit, et la concentration utilisable pour obtenir un taux de croissance identique à celui de *Rh. mucilaginosa*, est de 30 $\mu\text{g/ml}$ de milieu.

Après 4 jours de culture des levures en présence de 2-hydroxybiphényle, l'analyse des caroténoïdes montre l'absence totale de tous les pigments majeurs et ne révèle que des traces de neurosporène, de ζ carotène et parfois de β zéacarotène. Le phytofluène, déjà relativement faible dans les conditions normales de culture, reste pratiquement inchangé, mais le phytoène au contraire atteint un taux très élevé.

TABLEAU XI

Teneur en phytoène dans les levures après 4 jours de culture en présence de 2-hydroxybiphényle. (Température ambiante - aération 1l/m).
Résultats en $\mu\text{g/g}$ m.s.

	RMP	RO ₁	RJ ₁	<i>Rh. aurantiaca</i> 2200
Culture normale	120	130	83	140
Culture en présence de 2-hydroxybiphényle	238	275	242	510

d) CONCLUSION

De l'ensemble des résultats, il apparaît que l'activité des différentes substances est fort différente chez *Phycomyces* et chez les levures étudiées. En effet, nous constatons que la β ionone, non seulement ne provoque pas une augmentation de synthèse du β carotène chez *Rhodotorula mucilaginosa*, mais bien au contraire favorise la destruction de ce pigment.

Le 2-hydroxybiphényle inhibe la synthèse des caroténoïdes chez les levures alors qu'il est sans action sur la pigmentation des *Phycomyces* et de certaines bactéries (53).

Quant aux résultats obtenus avec l'acide déhydroacétique, ils nous permettent de constater une augmentation de la quantité des pigments majeurs cycliques chez des levures dont la croissance est fortement inhibée. Ces derniers résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par GOODWIN et OSMAN (22) chez *Rhodospirillum rubrum* cultivé en présence de streptomycine, et il est intéressant de noter qu'un des modes d'actions de l'antibiotique et du fongicide sur la croissance des microorganismes serait dû, dans les deux cas, à une inhibition des phénomènes respiratoires.

CHAPITRE V

ETUDE CINETIQUE DE LA SYNTHÈSE DES CAROTENOÏDES

INTRODUCTION

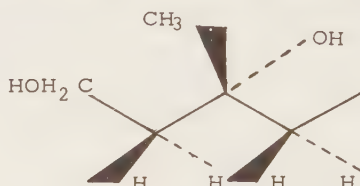
A la suite d'expériences réalisées sur des fruits de tomate, PORTER et coll. ont émis l'hypothèse de la formation des caroténoïdes par déshydrogénations successives d'un précurseur commun en C40, et proposé un premier schéma (48) selon lequel la cyclisation s'effectuerait au stade du lycopène. Après la découverte du β zéacarotène par PETZOLD et coll. (47) le schéma fut complété en envisageant une cyclisation au niveau du neurosporène (49) (Cf page 2). Cependant les résultats fournis par l'étude de l'incorporation du ^{14}C mévalonate dans les caroténoïdes de fruits de tomate semblent incompatibles avec une telle filiation, et plaident au contraire nettement en faveur d'une synthèse des différents polyènes selon des voies parallèles. Chez *Phycomyces blakesleanus* et *Neurospora crassa*, le β carotène se forme indépendamment des autres pigments (71) et, semble-t-il, à partir d'un précurseur différent du phytoène (25). Cependant une étude récente sur la formation des caroténoïdes chez *Phycomyces* montre qu'après culture en présence de diphenylamine et élimination de l'inhibiteur, le β carotène se synthétise aux dépens d'un polyène de la série du phytoène (25). Chez *Rhizophlictis rosea*, DAVIES (12) constate que le γ carotène ne se synthétise pendant la croissance que lorsque le lycopène a atteint son taux maximum et, à l'aide de ^{14}C mévalonate, démontre que ce γ carotène ne provient pas du lycopène. La cyclisation du lycopène est donc exclue, contrairement aux résultats de DECKER (13) qui, utilisant des chloroplastes, réussit à transformer du ^{14}C lycopène en ^{14}C β carotène. Ces hypothèses selon lesquelles une filiation entre les caroténoïdes ne peut se concevoir, se trouvent étayées par les résultats de l'étude des pigments chez *Rh. mucilaginis* et plusieurs mutants de cette levure (64).

Suivant les travaux auxquels on se réfère, on peut admettre ou rejeter un enchaînement entre ces polyènes en C40, mais en ce qui concerne l'origine de tous ces dérivés polyéniques, il semble que le phytoène soit un des premiers éléments. En outre, il paraît acquis actuellement que la biosynthèse du squelette tétraterpénique se réalise à partir d'un corps en C5, l'isopentényl pyrophosphate ; de nombreuses études réalisées à l'aide d'éléments marqués ont démontré que ce dernier s'isomérisait en diméthylallyl-pyrophosphate sous l'action d'une isomérase.

La condensation de l'isopentényl PP avec une molécule de diméthylallyl-pyrophosphate conduit au géranyl-pyrophosphate en C10. Sur ce composé se fixe par la suite une autre molécule d'allyl-pyrophosphate et il

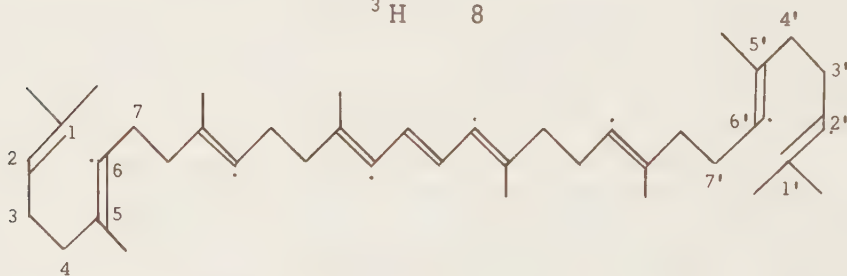
en résulte le farnésyl-pyrophosphate. La dimérisation de ce composé en C15 mène au squalène en C30. Mais sous l'action d'une géranyl-géranyl PP synthétase (32), le farnésyl PP se condense avec l'isopentényl PP pour donner une unité en C20, le géranyl-géranyl-pyrophosphate ; celui-ci se dimérise à son tour pour donner naissance au premier polyène à quarante atomes de carbone qui, pour certains auteurs, serait le phytoène, pour d'autres le lycopersène.

Il est bon de rappeler que jusqu'au stade du farnésyl-pyrophosphate la synthèse des caroténoïdes apparaît comme identique à celle du squalène ; quelques données relatives à la biosynthèse de ce dernier composé ont été récemment apportées par CORNFORTH, POPJAK et coll. Utilisant de l'acide mévalonique (2^{14}C (4S) 4^3H et 2^{14}C (4R) 4^3H), ces auteurs ont en effet démontré qu'au cours de la formation du squalène, c'est toujours le tritium 4S qui se trouve éliminé, le tritium 4R restant dans la molécule (11).



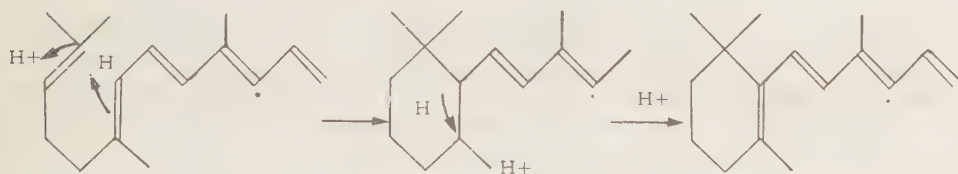
Un processus identique se retrouve dans la synthèse du phytoène (24), en effet en incubant des tranches de carotte avec de l'acide mévalonique 2^{14}C (4R) 4^3H , les carottes 2-2', 6-6', 10-10' et 14-14' du phytoène sont porteurs de tritium, ce qui donne pour ce polyène un rapport

$$\frac{{}^{14}\text{C}}{{}^3\text{H}} = \frac{8}{8}$$



Dans les mêmes conditions, le β carotène fournit un rapport $\frac{{}^{14}\text{C}}{{}^3\text{H}}$ égal à $\frac{8}{6}$ qui correspond à l'élimination de deux atomes de tritium situés en 6 en 6'. Cette élimination aurait lieu en deux étapes : le premier atome de

tritium serait éliminé au niveau du neurosporène avec formation de β zéa-carotène, le second au niveau du γ carotène avec formation de β carotène. Le schéma réactionnel serait le suivant :

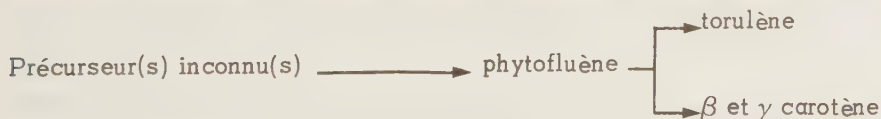


Cette étude a en outre permis de prouver que le noyau α ionone ne provient pas d'une isomérisation du noyau β ionone, car le rapport de la radioactivité trouvé pour l' α carotène est de $\frac{8}{7}$ alors qu'il devrait être de $\frac{8}{6}$ si ce pigment dérivait du β carotène.

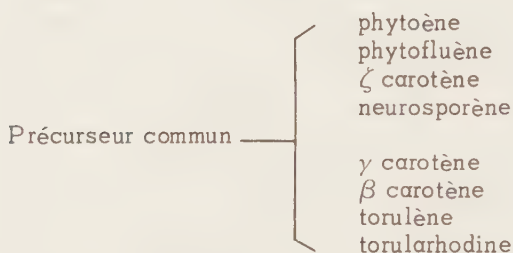
Ces résultats sont certes compatibles avec les hypothèses selon lesquelles la cyclisation aurait lieu après la synthèse de la chaîne en C40, mais le mécanisme proposé ne permet pas d'exclure la formation d'un hydrocarbure en C40 relativement saturé mais cyclique. Un tel dérivé peut être une forme cyclique soit du phytoène, soit du phytofluène, mais les techniques actuelles ne permettent pas la recherche et l'identification de ces composés.

De plus, les expériences à l'aide de tritium, ne vont nullement à l'encontre des hypothèses de MACKINNEY (40) qui suggère que la cyclisation peut se réaliser déjà au niveau de l'unité en C20. Dans ce cas, les caroténoïdes acycliques proviendraient de l'union de deux unités en C20 acycliques, les caroténoïdes monocycliques résulteraient de la condensation d'une unité en C20 acyclique avec une unité cyclique en C20, enfin la dimérisation de deux unités cycliques en C20 conduirait à la formation des caroténoïdes bicycliques.

Dès les premières études de la caroténogénèse chez les levures pigmentées en rouge, on a cherché à élucider la formation des carotènes bien que pour beaucoup d'entre eux la structure n'était pas exactement connue. Les résultats expérimentaux ont toujours conduit à montrer qu'il existe pour ces composés des voies de formation indépendantes. C'est ainsi que BONNER et coll. (6) ont proposé le schéma suivant chez *Rh. rubra* :



et VILLOUTREIX (63) a suggéré chez *Rh. mucilaginosa* un mode de formation identique à celui qu'avait proposé GOODWIN chez *Phycomyces blakesleanus*.



Mais l'origine de la torularhodine a fait l'objet d'autres hypothèses, c'est ainsi que pour WINTERSTEIN et coll. (67) le γ carotène se transforme en torulène puis en torularhodine. Telle est également la voie proposée par SIMPSON (58) chez *Rhodotorula glutinis*; encore faut-il objecter que chez *Rh. mucilaginosa*, selon VILLOUTREIX (63), le β zéacarotène et le β carotène peuvent être des précurseurs possibles du torulène et de la torularhodine.

Les résultats des travaux que nous venons de rapporter montrent qu'il existe de nombreux arguments pour considérer l'hypothèse de PORTER et LINCOLN comme non valable. Il faut cependant remarquer que bon nombre de ces résultats ont été obtenus à la suite d'expériences dans lesquelles le taux des différents caroténoïdes a été déterminé sur des organes ou des cellules dont la croissance ou la pigmentation avait atteint un stade terminal. Dans ces conditions, la présence en faible quantité ou même l'absence d'un pigment excluait un rôle possible comme intermédiaire dans une chaîne métabolique donnée. Il peut s'agir en fait d'un composé très actif, dont la transformation est plus ou moins prononcée au moment où l'on effectue la détermination.

Les études comparatives sur des mutants dont la caroténogénèse est perturbée à certains stades sont restées relativement limitées. Les résultats obtenus après culture n'échappent pas à la critique précédente; de plus, il s'avère parfois difficile de démontrer que le composé, qui s'accumule par suite du blocage de la biosynthèse à un stade déterminé, représente un précurseur réel et non un produit secondaire. Enfin, on constate assez fréquemment que la mutation ne provoque pas une interruption nette de la formation de certains caroténoïdes, qui continuent à être synthétisés à des taux très faibles, et la signification de leur présence est loin d'être évidente.

De rares tentatives ont été faites pour obtenir la transformation de quelques polyènes par des extraits acellulaires. Malheureusement, même

dans les cas les plus favorables, les systèmes ont un rendement très faible, et ne permettent de préciser ni le nombre, ni la nature des intermédiaires pouvant intervenir dans la transformation observée.

Les expériences réalisées avec des substrats marqués au ^{14}C n'ont pas jusqu'à présent apporté d'argument décisif ; elles ont en effet fourni des résultats qui, s'ils sont compatibles avec l'hypothèse de PORTER et LINCOLN, ne sont pas pour autant incompatibles avec une formation des caroténoïdes selon des voies indépendantes.

Nous avons donc tenté au cours de la présente étude de confirmer ou d'exclure le rôle de précurseur des caroténoïdes acycliques, en particulier du lycopène, dans la formation des caroténoïdes cycliques. De plus, nous avons cherché à vérifier dans quelle mesure le schéma proposé par WINTERSTEIN peut rendre compte du mécanisme de formation de la torularhodine chez *Rhodotorula*.

La méthode que nous avons choisie, consiste à suivre la formation des pigments à partir d'un composé préalablement accumulé dans les cellules : nous cultivons les levures en présence de 2-hydroxybiphényle qui inhibe la caroténogénèse et provoque une accumulation de phytoène. L'inhibiteur est ensuite éliminé et les levures sont placées en aération dans un tampon phosphate sans source nutritive. En effectuant des prélèvements échelonnés sur 140 heures, nous avons pu suivre l'évolution du taux des différents pigments. L'oxygénation des cellules est indispensable car différents essais nous ont prouvé que sous azote ou sous CO_2 , aucune pigmentation ne se développe. Cette méthode a l'avantage de ne pas nécessiter une purification rigoureuse, mais demande des extractions quantitatives et une très bonne séparation des différents composés.

ETUDE DE L'EVOLUTION DES PIGMENTS CHEZ RHODOTORULA MUCILAGINOSA RMP

Au cours des études de l'influence de la température nous avons observé la possibilité d'une transformation des polyènes acycliques en pigments cycliques, en outre nous avons caractérisé le lycopène dans les mutants de *Rh. mucilaginosa*, mais jamais dans la souche mère. Il paraissait donc douteux que ce polyène puisse jouer un rôle dans la formation des caroténoïdes cycliques.

Or pendant les premières heures après la levée d'inhibition, nous avons isolé chez RMP un composé dont le spectre est identique au lycopène. En appliquant les techniques déjà décrites nous l'avons identifié à ce pigment.

Nous avons alors déterminé les taux du lycopène, de γ carotène, de β carotène, du torulène et de la torularhodine au cours de 10 prélèvements étalés sur 168 heures. L'évolution des taux est reproduite dans la figure 7.

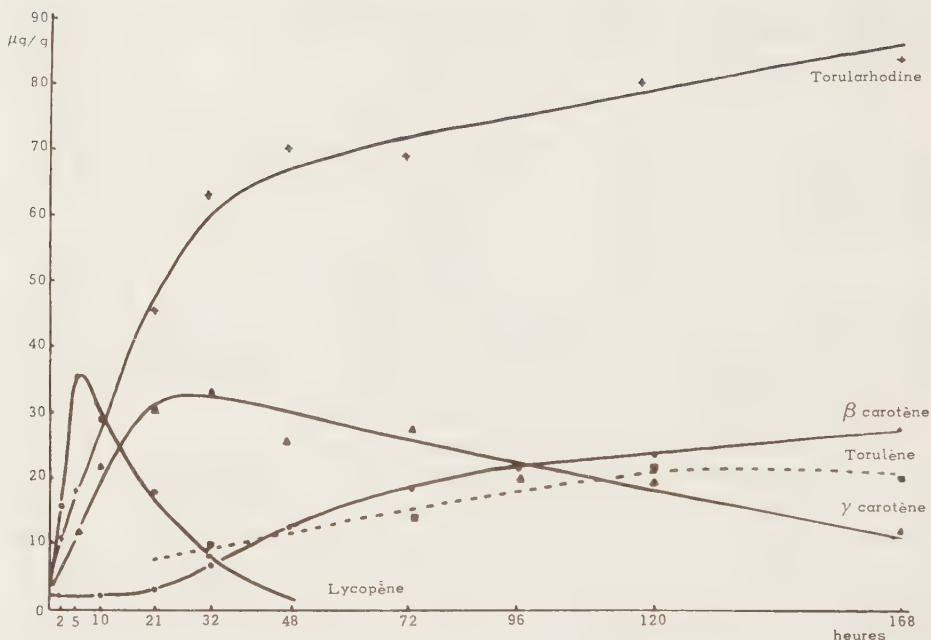


FIGURE 7

Evolution du taux des pigments dans la souche RMP au cours de coloration en tampon phosphate, après élimination du 2-hydroxybiphényle.

Le lycopène atteint rapidement un taux maximum puis décroît, ce qui nous amène à penser qu'il peut être considéré comme le précurseur commun des autres pigments ; le γ carotène, dont le maximum est obtenu immédiatement après celui du lycopène peut en provenir directement. Les taux du β carotène d'abord stables pendant 20 heures présentent après des valeurs continuellement croissantes correspondant à la formation d'un composé final, et comme la diminution du γ carotène s'accompagne de l'augmentation du β carotène, nous pouvons envisager la cyclisation du γ et β carotène.

Le torulène non décelable pendant les vingt premières heures, présente ensuite un taux lentement croissant.

Le taux de la torularhodine n'a pas de maximum comme celui du β carotène, il augmente continuellement, très rapidement d'abord, plus modérément après ; la torularhodine peut également être considérée comme un composé final.

Le fait que la concentration du torulène reste faible par rapport à celle de la torularhodine signifierait que sa vitesse de transformation n'est que légèrement inférieure à sa vitesse de formation du moins au début. Puis la vitesse de transformation décroît, ce qui permet de déceler le torulène vers la vingtième heure d'incubation. Aussi à partir du lycopène nous pouvons, en nous rapportant au schéma proposé par SIMPSON (57), proposer l'enchaînement suivant des pigments cycliques.



Selon l'hypothèse de WINTERSTEIN et coll. la transformation du torulène en torularhodine se ferait par l'intermédiaire du 3'-4'-déhydro-18'-oxo- γ carotène, nous n'avons jamais pu suivre l'évolution de ce pigment, ni celle du 3'-4'-déhydro-18'-hydroxy- γ carotène, leur taux étant trop faible.

ETUDE DE L'EVOLUTION DES PIGMENTS CHEZ LE MUTANT RO₁

Cultivée en milieu liquide la souche RO₁ synthétise habituellement le lycopène, l'alcool et l'aldéhyde en C40. Aussi avons-nous tenté de suivre l'évolution de ces pigments comme nous l'avons fait pour la souche mère.

Mais en tampon le comportement du mutant est assez décevant car nous observons une "floculation" progressive des levures au fond du ballon. Aussi nous n'avons pas poursuivi l'aération au delà de 70 heures.

Dans le tableau XII nous rapportons les résultats que nous avons obtenus.

TABLEAU XII
Evolution des pigments chez le mutant RO₁
 $\mu\text{g/g}$ de levure sèche.

Temps d'incubation en tampon phosphate :	0 h.	23 h.	46 h.	70 h.
Lycopène	traces	102	119	47,5
γ carotène	traces	9,7	12,5	11,3
β carotène	traces	6,3	13,5	18,8
Torulène	traces	traces	traces	40
Alcool C40	0	traces	traces	traces
Aldéhyde C40	traces	traces	10,4	10,6

En comparant l'évolution des taux des différents pigments chez ce mutant par rapport à ceux de la souche mère RMP, nous constatons que le lycopène, dans un premier temps, s'accumule puis diminue.

Le taux de γ carotène passe par un maximum vers 46 heures tandis que le taux de β carotène augmente progressivement.

Le torulène à l'état de trace au début s'accumule vers 70 heures.

L'alcool en C40 reste constamment à l'état de traces indosables pendant toute l'expérience.

Quant à l'aldéhyde en C40 décelable dès le début, nous observons un taux plus élevé mais pratiquement stable après 46 heures.

Il apparait donc que le lycopène et le γ carotène sont des intermédiaires, alors que le β carotène est un corps final ; ces résultats sont en accord avec ceux observés dans la souche mère RMP.

Pour les autres pigments une telle cinétique est difficile à interpréter, cependant les résultats ne sont pas incompatibles avec la possibilité d'une transformation rapide du torulène en 3'-4'-déhydro-18'-oxo- γ carotène par l'intermédiaire de l'alcool en C40 ; cette transformation étant ralentie vers 70 heures.

Mais au cours de cette expérience nous avons pu séparer par chromatographie un pigment dont les maximums du spectre d'absorption dans l'éther de pétrole sont à 447-475 et 506 m μ , c'est-à-dire très proches de ceux du lycopène. A partir de la 23ème heure ce pigment inconnu se retrouve dans les cellules à une concentration qui permet de l'isoler et de suivre son évolution. Celle-ci est parallèle à l'évolution du lycopène mais les teneurs sont plus faibles.

Nous avons tenté une ébauche d'identification de ce pigment. Dans la figure 8 nous présentons son spectre d'absorption dans quatre solvants usuels.

Voir figure 8 page suivante.

Sur alumine d'activité I et III, le pigment est plus fortement absorbé que les carotènes hydrocarbures, et par chromatographie sur couche mince en phase inversée, il a un R_f supérieur à ces derniers. Ces caractères chromatographiques marquent la présence d'un oxygène dans sa molécule. Le spectre du pigment isolé est semblable à celui du β -apo-2' caroténol (C37) que nous avons caractérisé dans cette souche après culture, mais les comportements chromatographiques de ces deux pigments sont différents

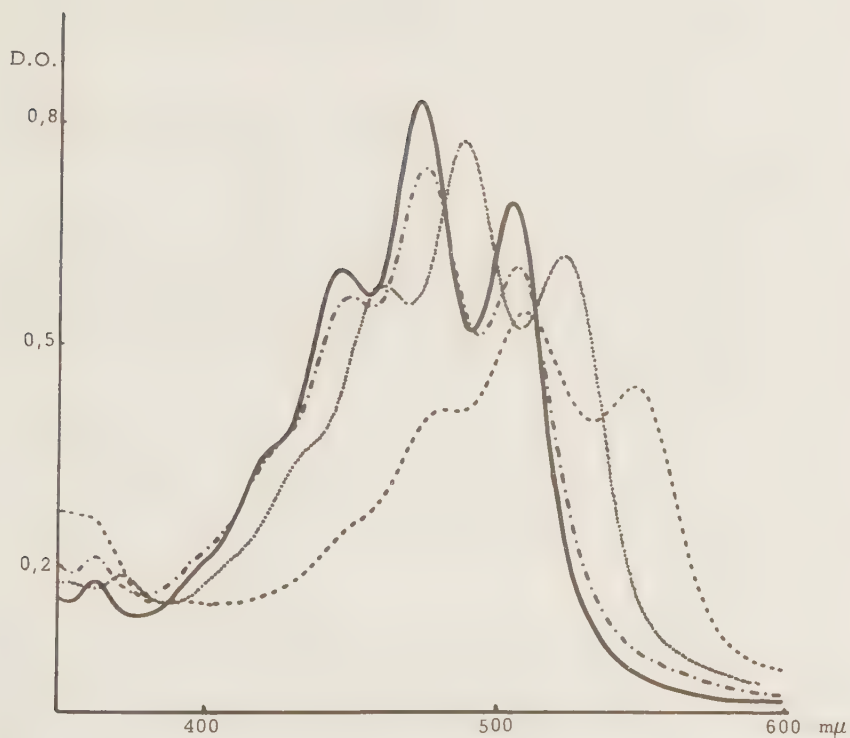


FIGURE 8

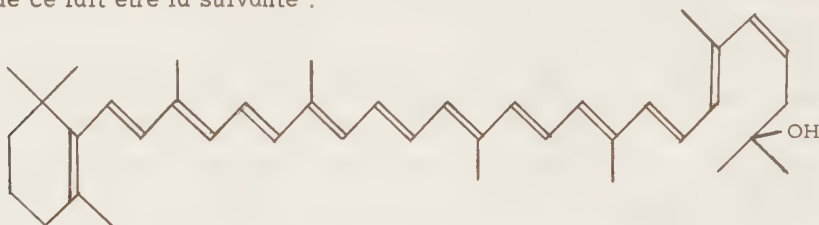
Pigment inconnu, isolé du mutant RO₁ en cours de coloration après élimination du 2-hydroxybiphényle.

- Spectre dans l'éther de pétrole
- . - . - Spectre dans l'alcool éthylique
- Spectre dans le benzène
- Spectre dans le sulfure de carbone

et l'acétylation par l'anhydride acétique, facilement réalisable sur l'alcool en C37, ne l'est pas sur le pigment isolé. Ceci exclut donc la présence d'hydroxyde alcoolique primaire et secondaire. Nous n'avons pas réussi à déterminer dans ce pigment la présence de groupements carbonyles, car après réduction à l'aide d'hydrure de lithium et d'aluminium, nous n'observons pas de modification du spectre.

Aussi suggérons-nous que la présence de l'oxygène est due à un groupement hydroxyle tertiaire dans la molécule. Mais faute de posséder une quantité suffisante de produits, nous n'avons pas poursuivi plus avant son identification.

Toutefois comme le premier sommet de son spectre d'absorption est peu prononcé, et comme ce spectre est identique à celui de l'alcool cyclique en C37, nous pouvons penser à la présence d'un cycle dans le pigment, mais il faut alors un chromophore à douze doubles liaisons conjuguées pour justifier la place des sommets à 475 et 506 m μ . La formule de ce pigment peut de ce fait être la suivante :



Ces études cinétiques renouvelées plusieurs fois sur *Rh. mucilaginos* RMP et RO₁ et bien que les techniques de dosage des différents caroténoïdes soient longues et nécessitent une série de manipulations délicates, nous avons toujours constaté une même variation des taux des différents pigments.

ETUDE DE LA VARIATION DES PIGMENTS DE *RHODOTORULA AURANTIACA*

Chez *Rh. mucilaginos*, nous avons montré qu'il est possible de mettre en évidence une interconversion des polyènes acycliques en pigments cycliques, nous avons de plus, pu montrer le rôle d'intermédiaire du lycopène, Or récemment une étude (45) a démontré que le phytoène est le précurseur des polyènes acycliques, aussi avons-nous tenté de vérifier sur une autre espèce, d'une part s'il est possible d'attribuer au phytoène le rôle de précurseur de tous les caroténoïdes, et d'autre part s'il est possible de retrouver la filiation des pigments cycliques telle que nous l'avons entrevue.

TABLEAU XIII

Rhodotorula aurantiaca

Variation dans le temps du taux des pigments après levée d'inhibition
 Tampon phosphate pH 4,2. Résultats en $\mu\text{g/g}$ levure sèche

Heures	0	1/2	2	5	10	21	32	48	72	144
Phytoène	580	540	440	360	300	180		60		25
Neurosporène	7	12,8	16,5	12,5	3,7	traces				
β zéacarotène	2	3,3	2,6	0,9	traces					
Lycopène	5,2	15	15	10	5				15	9,5
γ carotène	9,5	22,5	62	93,5	90	40	36	24	84	76
β carotène	5,6	5,5	11	17,5	36,5	51	72	76	30	30
Torulène	0	traces	33	50	68	73	72	41	130	105
Torularhodine	0	traces	22,5	43	59	100	105	118		
TOTAL	609,3	599,1	602,6	587,4	562,2	444	285	319	259	245,5

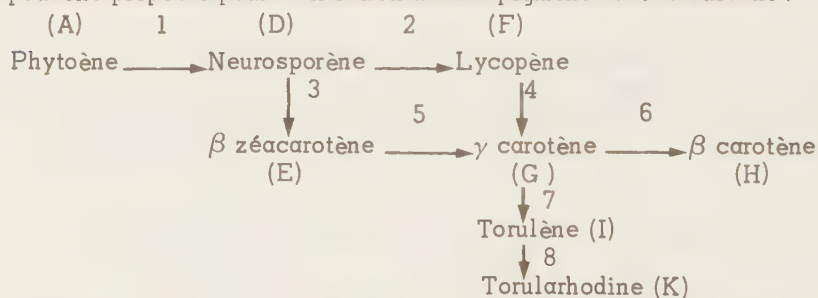
Nous avons utilisé pour cette expérience *Rh. aurantiaca* qui, en culture, synthétise davantage de carotènes que *Rh. mucilaginosa*. En opérant de la même manière que précédemment, nous avons suivi les transformations des pigments dans cette espèce. Il nous a été impossible de suivre l'évolution de tous les polyènes, c'est pourquoi nous n'avons pas dosé le phytofluène et le ζ carotène qui sont, semble-t-il, les précurseurs du neurosporène.

Les variations du taux des pigments sont rapportées dans le tableau XIII.

On constate que seul le taux de phytoène est continuellement décroissant, ce polyène est donc le précurseur de tous les autres pigments. Les dosages du β carotène révèlent que sa valeur est constamment croissante, ce qui indique que ce pigment est un corps final. De même l'augmentation continue de la torularhodine implique qu'il s'agit également d'un produit final.

Enfin les valeurs obtenues pour le neurosporène, le β zéacarotène, le lycopène, le γ carotène et le torulène atteignent à des moments donnés des taux maximums puis décroissent, ce qui montre nettement que ces pigments sont des produits intermédiaires dans une filiation.

La structure de tous ces pigments est actuellement connue, et en se référant au principe de la plus grande simplicité des réactions élémentaires (principe du moindre changement de structure), le seul schéma que nous pouvons proposer pour la filiation de ces pigments est le suivant :



On peut chercher à mettre en équation un tel processus de filiation et, si l'on suppose que ces réactions sont irréversibles et du premier ordre, les équations cinétiques s'écrivent :

$$\frac{dA}{dt} = -K_1 A$$

$$\frac{dD}{dt} = K_1 A - K_2 D - K_3 D$$

$$\frac{dE}{dt} = K_3 D - K_5 E$$

$$\frac{dF}{dt} = K_2 D - K_4 F$$

$$\frac{dG}{dt} = K_4 F + K_5 E - K_6 G - K_7 G$$

$$\frac{dH}{dt} = K_6 G$$

$$\frac{dI}{dt} = K_7 G - K_8 I$$

$$\frac{dL}{dt} = K_8 I$$

La filiation des pigments à partir d'un précurseur implique que leur somme reste constante, aux erreurs expérimentales près, pendant toute la durée de l'expérience. Or, d'après le tableau XIII, cette condition ne semble remplie que jusqu'à la dixième heure, et après 140 heures d'aération, la perte globale est de 360 μ g par gramme de matière sèche, ce qui représente environ 60 % de la somme initiale. Un phénomène analogue a été observé par SIMPSON (58) chez *Rh. glutinis* dont le taux global en pigments baisse dès le cinquième jour de culture. Cette baisse peut s'expliquer par le fait que la torularhodine, produit final quantitativement le plus important, est particulièrement sensible à l'oxydation. C'est pourquoi nous pensons qu'au cours de l'incubation en tampon, la perte globale est imputable à une altération de la torularhodine.

Nous pouvons calculer la concentration virtuelle de ce pigment en lui donnant une valeur qui permet de satisfaire au bilan matière. Cette valeur nous l'obtenons en ajoutant à la valeur expérimentale le déficit global enregistré ; ceci nous donne les points représentés par les signes $\oplus \oplus$ de la figure 9.

L'examen du tableau XIII révèle de plus que même au bout de 140 heures les intermédiaires tels que le γ carotène et le torulène ne disparaissent pas complètement. Or selon les équations différentielles représentant le mécanisme de filiation proposé, on devrait s'attendre à ce que les valeurs de ces intermédiaires s'annulent. Il n'en est rien, on peut penser (ainsi que d'autres travaux du laboratoire l'ont montré (44)), qu'il s'agit vraisemblablement d'un ralentissement des réactions biochimiques dû à une altération des systèmes enzymatiques dans les levures maintenues en milieu tampon sans source azotée et carbonée.



FIGURE 9

Rhodotorula aurantiaca. Cellules non proliférantes.

Evolution des taux des pigments en tampon phosphate après élimination du 2-hydroxybiphényle.

Courbes calculées à l'aide d'une calculatrice analogique.

A : Phytoène, D : Neurosporène, E : β zéacarotène, F : Lycopène, G : γ carotène, H : β carotène, I : Torulène, K : Torularhodine = courbe calculée avec les valeurs expérimentales.
L : Torularhodine = valeurs théoriques.

Nous avons supposé une destruction exponentielle des enzymes en fonction du temps et nous avons résolu, sur calculatrice analogique, le système d'équations ainsi obtenu à partir du système ci-dessus.

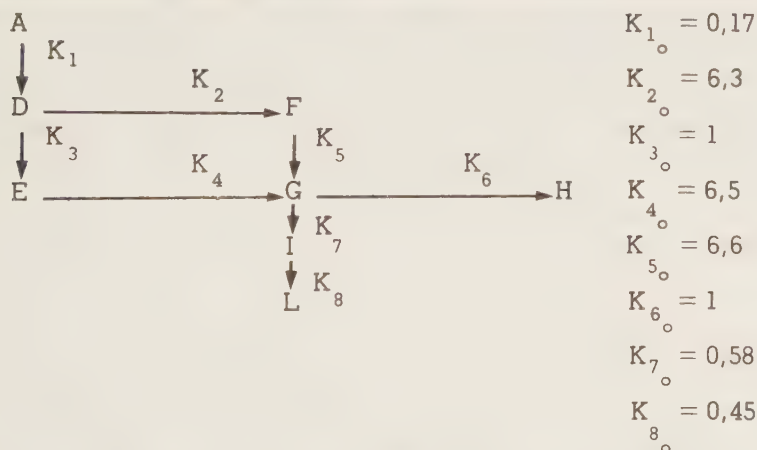
Le tableau XIV donne les valeurs numériques initiales des constantes de vitesse, qui permettent aux courbes théoriques de coïncider au mieux avec les valeurs expérimentales (voir figure 9) ; l'altération des enzymes est exprimée par l'équation :

$$K_i = K_{i0} e^{-\gamma t} \text{ où } i = 1.2.3.4.5.6.7.8. \text{ et } \gamma = 0,023 \text{ h}^{-1}$$

γ représente donc la vitesse de décomposition des enzymes : la valeur numérique trouvée signifie que les enzymes voient leur activité diminuée dans un rapport 10 au bout de 80 heures environ.

TABLEAU XIV

Constantes des vitesses de formation et disparition des caroténoïdes



Ainsi le schéma de filiation que nous nous sommes efforcés de démontrer, et qui est théoriquement le plus plausible et le plus simple, peut être confirmé par le calcul dont les résultats plaident en faveur du schéma de filiation proposé.

Ce travail nous a permis de montrer le rôle de précurseur du phytonène ; ainsi se trouve éliminé l'hypothèse selon laquelle ce polyène est un produit secondaire dont la synthèse se trouve fortement stimulée en présence de 2-hydroxybiphényle.

D'autre part selon plusieurs auteurs (58), l'étape neurosporène - lycopène $\rightarrow$ γ carotène ne semble pas exister dans les souches mères des levures du genre *Rhodotorula*. Or en effectuant une levée d'inhibition, nous avons pu mettre en évidence la formation de lycopène dans toutes les souches de *Rhodotorula* étudiées au laboratoire, et chez *Rh. mucilaginosa* et *aurantiaca* ce pigment présente toutes les caractéristiques d'un intermédiaire dans la biosynthèse des caroténoïdes cycliques.

Chez *Rh. aurantiaca*, au cours de la cinétique, les constantes des vitesses de formation (K_2) et de disparition (K_4) du lycopène sont presque identiques, ce qui explique ses faibles teneurs ; en tenant compte des constantes de vitesse de formation (K_3) et de disparition (K_5) du β zéacarotène, le γ carotène se formerait à raison de 14 % seulement par l'intermédiaire du β zéacarotène et de 86 % par l'intermédiaire du lycopène.

Enfin, il apparaît évident que chez *Rh. aurantiaca* les vitesses de transformation des caroténoïdes sont différentes pour chaque pigment, et chez *Rh. mucilaginosa*, en observant les courbes d'évolution des pigments, nous pouvons en déduire la même conclusion. Ceci confirme l'objection que nous avons faite au début de ce chapitre, et dans laquelle nous avons réfuté les arguments de certains auteurs qui ont rejeté le rôle d'intermédiaire de certains caroténoïdes, tel que le lycopène, pour la raison que leur teneur était trop faible dans ces microorganismes.

CHAPITRE VI

EXCRETION DE PORPHYRINES PAR DES SOUCHES NORMALES ET MUTANTES DE RHODOTORULA MUCILAGINOSA

Au cours d'expériences ayant pour but de déterminer l'influence de la température sur la caroténogénèse chez *Rhodotorula mucilaginosa*, nous avons constaté que les milieux de certaines cultures présentaient une coloration rose inhabituelle. En lumière ultraviolette, cette coloration fait place à une intense fluorescence rouge que nous avons aisément pu attribuer à la présence de porphyrines excrétées par les cellules de levures durant leur croissance.

L'excrétion de porphyrines par certaines espèces de *Saccharomyces* est certes connue depuis longtemps mais elle ne semble pas avoir été observée chez des levures *Rhodotorula*. De plus, notre attention a été rapidement attirée par le fait que l'intensité de la fluorescence était différente pour des souches présentant entre elles des variations importantes dans la composition en caroténoïdes. Enfin, l'élévation de la température d'incubation qui, nous l'avons vu au chapitre IV, modifie la caroténogénèse, amène également des variations très importantes dans l'excrétion des porphyrines. Ceci nous a incités à étudier de plus près ce phénomène afin de mettre en évidence une éventuelle relation entre le métabolisme des caroténoïdes et celui des porphyrines.

NATURE DES PORPHYRINES EXCRETEES

a) Extraction

Après trois jours de culture, les cellules sont récoltées par centrifugation et le milieu, de pH voisin de 3, additionné des eaux de lavage du culot, est épuisé à plusieurs reprises par de l'acétate d'éthyle. Les solutions organiques rassemblées, contenant les porphyrines, sont lavées deux fois à l'eau distillée puis extraites par de l'acide chlorhydrique à 5 %. On poursuit cette extraction jusqu'à disparition de fluorescence rouge dans la dernière fraction chlorhydrique. Les extraits chlorhydriques amenés à pH 4,2 sont agités avec un volume égal d'éther sulfurique : la totalité des porphyrines passe dans la phase étherée.

b) Identification

Le fait que l'acide chlorhydrique à 0,5 % extrait la totalité de ces porphyrines à partir d'une solution étherée, montre qu'il ne s'agit que de porphyrines libres et non de métalloporphyrines. Sont également exclues,

d'une part l'uroporphyrine qui n'est pas extractible par l'éther sulfurique à partir de solutions aqueuses de pH 4,2, d'autre part la protoporphyrine qui ne passe en solution aqueuse que lorsque la concentration en HCl atteint au minimum 2 %.

En solution dans l'acétate d'éthyle ou l'éther sulfurique, les porphyrines présentent un spectre dont les principaux sommets se situent à 636 - 607 - 578 - 535 et 402 m μ . Dans l'acide chlorhydrique à 6 % les sommets se trouvent à 600 (575) - 556 et 405 m μ .

Nous nous trouvons donc en présence, soit d'un dérivé tétracarboxylé comme les coproporphyrines, soit d'un dérivé dicarboxylé comme la deutéro-, l'hémato- ou la mésoporphyrine.

Par chromatographie sur papier selon la technique d'ERIKSEN (16), ou sur couche mince selon la technique de JENSEN (30), nous avons obtenu la séparation de trois composés dont le plus important migre avec un Rf identique à celui de la coproporphyrine III. Les deux autres dérivés, en trop faible quantité pour être identifiés, peuvent correspondre soit à l'isomère I de la coproporphyrine, soit à une porphyrine di- ou tri-carboxylique. Leur Rf, nettement différent de celui de l'hématoporphyrine, exclue la présence de cette dernière.

La principale porphyrine, après estérification méthylique suivie de chromatographie, a été isolée et cristallisée. L'examen microscopique des cristaux et surtout leur point de fusion (150° C) ont permis de l'identifier à la coproporphyrine III (*).

DOSAGE DES PORPHYRINES

Les dosages ont été effectués par spectrophotométrie. La coproporphyrine III étant quantitativement la plus importante, nous avons toujours dosé la totalité des porphyrines en prenant comme coefficient d'extinction

E	1 %	6666 à 405 m μ dans l'acide chlorhydrique à 5 %.
1 cm		

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ de levure sèche.

ETUDE DE L'EXCRETION DES PORPHYRINES

Tous les travaux consacrés à l'excrétion des porphyrines par différents microorganismes font ressortir l'étroite relation qui existe entre ce phénomène et les conditions dans lesquelles sont effectuées les cultures.

(*) Nous remercions bien vivement Monsieur et Madame GAJDOS, Directeur de recherche à l'I.N.S.R.M. pour l'intérêt et les facilités qu'ils nous ont accordés pour cette identification des porphyrines.

Dans tous les cas, l'anaérobiose représente le facteur essentiel, et l'introduction d'oxygène dans les cultures amène invariablement une diminution considérable ou même la suppression totale de toute excrétion de porphyrines.

Chez une bactérie photosynthétique, *Rhodospseudomonas sphéroïdes* (36), l'excrétion de porphyrines en anaérobiose est pratiquement limitée à la phase finale de croissance et coïncide avec le maximum du taux de formation de la bactério-chlorophylle. Par ailleurs, chez certains microorganismes non photosynthétiques, on a pu montrer, dans certains cas, que l'excrétion de porphyrines semblait liée à la perte de synthèse du cytochrome C en anaérobiose (59).

Or, la croissance de *Rh. mucilaginosa* n'est possible que dans des milieux fortement aérés ; nous avons donc été quelque peu surpris de constater une apparition de porphyrines extracellulaires dans ces conditions. Il est vrai qu'à température ambiante nous n'avons trouvé que des quantités minimales de coproporphyrine ; mais lorsque la température de culture est portée de 20° à 30°, le taux d'excrétion s'élève considérablement.

TABLEAU XV

Influence de la température sur l'excrétion des porphyrines. Milieu liquide. Aération 0,5 à 1 litre d'air par minute. (μg par g de levure sèche)

Souches	RMP	RO ₁	RJ ₁
Température ambiante 20-22°	15 à 45	20 à 25	25 à 40
Température 30-32°	160 à 250	50 à 60	240 à 310

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de données concernant une influence similaire de la température chez d'autres microorganismes, ce qui, joint au fait que cette influence s'exerce en aérobiose chez *Rh. mucilaginosa*, nous porte à croire que le passage de coproporphyrine dans le milieu de culture est lié à un phénomène tout à fait différent de ceux jusqu'à présent mis en évidence chez d'autres organismes.

Or en activant les levures à 30° la répartition quantitative des caroténoïdes est sensiblement modifiée par rapport à la normale (cf tableau V, page 28) ; ceci nous a conduits à envisager l'intervention d'enzyme (s) à groupement héminique dans la caroténogénèse de *Rh. mucilaginosa* et plus particulièrement lors de la formation de la torularhodine.

En effet, à 30° la souche mère voit son taux de torulène augmenter de façon appréciable alors que la quantité de torularhodine formée reste pratiquement inchangée. Ce fait peut s'expliquer en supposant que l'activité du système enzymatique permettant le passage du torulène à la torularhodine n'est pas stimulée à 30° ou, plus vraisemblablement, que la formation du ou des enzymes impliqués dans la synthèse de la torularhodine est déficiente.

En fait le passage de porphyrine dans le milieu extérieur pourrait traduire une telle déficience, les cellules étant apparemment incapables d'utiliser pour la synthèse d'enzymes hémiques, la totalité des groupes tétrapyrroliques formés.

Nous retrouverons là, semble-t-il, un phénomène déjà mis en évidence chez *Saccharomyces* lors de l'étude de la biosynthèse des hémoprotéines induite par l'oxygène (60). Cette induction concerne en premier lieu la synthèse de la partie protéique des enzymes et l'on comprend donc facilement que lorsque cette dernière est insuffisante, elle constitue un facteur limitant l'utilisation des groupes tétrapyrroliques.

Si la biosynthèse de la torularhodine chez RMP est limitée par la quantité d'apoenzyme inductible par l'oxygène, on doit observer dans les cultures intensément aérées, une augmentation du taux de torularhodine. L'expérience montre qu'il en est bien ainsi. En effet, lorsque le débit d'air des cultures est porté de 1 l à 5 l par minute, on constate une augmentation de 50 % de torularhodine, et une importante diminution de l'excrétion de porphyrines.

A la suite de ces résultats, il nous a paru intéressant d'étudier le comportement des deux mutants RJ₁ et RO₁.

La souche RJ₁ est surtout caractérisée par une déficience presque totale en torulène lorsque les cultures sont effectuées à 20° ; l'excrétion de coproporphyrines est très faible et le taux de torularhodine extrêmement bas. A 30°, on observe l'apparition de traces de torulène tandis que le taux de torularhodine reste pratiquement inchangé, mais on retrouve dans le milieu de culture une teneur en coproporphyrine supérieure à celle obtenue en cultivant RMP dans les mêmes conditions (tableau XV). De même que la souche mère, le mutant RJ₁ est donc incapable d'accroître sa teneur en torularhodine sous l'influence d'une élévation de la température de culture ; la mutation a vraisemblablement altéré de façon sévère le système enzymatique responsable de la formation du torulène.

Le mutant RO₁ représente un cas légèrement plus complexe que le précédent. En effet, par culture à 30°, cette levure synthétise une quantité de torulène 5 fois plus élevée que celle observée à 20°, mais le taux de torularhodine déjà nul à cette température reste inchangé à 30°. On retrouve donc, comme pour les deux précédentes souches, la même déficience du

système enzymatique conduisant à la torularhodine. Il faut de plus, noter que la faible excrétion de coproporphyrine constatée dans les cultures effectuées à 20°, n'est pratiquement pas augmentée en portant la température à 30°. Il semble donc que dans la souche RO₁, la mutation a non seulement totalement inactivé ou détruit le système formateur de la torularhodine, mais aussi modifié de façon importante le mécanisme d'excrétion des porphyrines.

Si la biosynthèse de certains caroténoïdes semble contrôlée par des enzymes à groupements héminiques, nous devons cependant exclure le rôle de cytochromes de type c et a qui sont inhibés par le cyanure ; nous avons en effet constaté qu'en présence de ce toxique, même à la concentration de 1 %, les levures, après levée d'inhibition, se pigmentent normalement. Ce résultat nous amène à envisager un rôle éventuel de cytochrome de type b.

Mais ajoutons à cela que l'iode-acétamide empêche la coloration des cellules en tampon lorsque le 2-hydroxybiphényle est éliminé, et ceci implique que des groupements -SH jouent un rôle dans la caroténogénèse.

En ce qui concerne les enzymes de nature hémoprotéique, il est difficile d'entrevoir la quantité d'enzyme qui est nécessaire à la synthèse d'un taux donné de torularhodine. Mais il est vraisemblable que l'excrétion de coproporphyrines, observée à 30°, est bien supérieure à celle qui résulterait d'une simple inhibition de la liaison hème-apoenzyme dans le système responsable de la formation de la torularhodine.

L'excès de porphyrine peut avoir une action toxique sur les systèmes enzymatiques des cellules. SILVESTEIN (56) a en effet montré que l'hématoporphyrine inhibe la succino-cyt.C réductase, la NADH cyt.C réductase etc ... Il fallait donc vérifier si les porphyrines excrétées n'exerçaient pas une action inhibitrice sur la caroténogénèse. Nous avons ajouté aux levures après levée d'inhibition des porphyrines à raison de 250 µg par gramme de levure sèche. Nous n'avons pas observé de modifications dans la composition en caroténoïdes.

Il était alors intéressant de voir si en supprimant l'excrétion des porphyrines la caroténogénèse était modifiée.

GAJDOS et coll. (18) ont montré que les nucléotides adényliques et l'ATP en particulier inhibent presque totalement l'excrétion de porphyrines chez *Rhodospseudomonas sphéroïdes*. Ajouté à la dose de 3 mM au milieu de culture habituel, l'ATP ne réduit en fait que de 50 % l'excrétion de coproporphyrines par *Rhodotorula mucilaginosa* et la composition qualitative et quantitative en caroténoïdes n'est pas modifiée par rapport à la levure témoin cultivée sans ATP. Bien que répétée de nombreuses fois, cette expérience a toujours montré que l'inhibition portant sur l'excrétion de porphyrines est beaucoup moins sévère que nous l'avions espéré et il semble difficile dans ce cas de pouvoir avancer des arguments valables pour ou contre

l'intervention d'enzymes à groupements hémiques dans la synthèse des caroténoïdes.

Nous avons alors recherché si l'inhibition de la caroténogénèse était susceptible de provoquer une perturbation importante de l'excrétion de porphyrines. On pouvait en effet espérer accroître de façon sensible cette extraction par suite de la non utilisation des enzymes impliqués dans la synthèse des caroténoïdes.

Lorsque les levures sont cultivées en présence de 2-hydroxybiphényle, elles ne se pigmentent pas et n'excrètent que de faibles quantités de porphyrines (8 à 13 $\mu\text{g/g}$ de matière sèche) quelle que soit la température de culture. L'action des dérivés du biphenyle sur des enzymes à groupements hémiques tels que cytochrome oxydase ou succino-oxydase a été signalée par L.G. ABOOD et R.W. GERARD (1) et d'autre part nous savons que chez *Rhodopseudomonas sphéroïdes*, le 2-hydroxybiphényle réduit de 50 % la synthèse des porphyrines (*). Aussi dans la levure est-il fort probable que parallèlement à une inhibition de la transformation du phytoène ce dérivé du biphenyle peut, soit empêcher la formation normale d'hémoprotéine en inhibant la synthèse des noyaux tétrapyrroliques, soit empêcher leur fonctionnement.

Un rôle important a déjà été attribué à des porphyrines dans la caroténogénèse de deux bactéries. En effet, BATRA et RILLING ont montré que chez *Mycobacterium marinum*, bactérie photochromogène (4), une porphyrine intervient comme pigment photorécepteur induisant la synthèse des caroténoïdes ; chez *Myxococcus xanthus* où un processus d'induction semblable paraît exister, la protoporphyrine IX a été isolée par BURCHARD et DWORKIN (9).

Rappelons que nous avons montré que chez *Rh. mucilaginosa* la biosynthèse des caroténoïdes n'est pas influencée par la lumière, par conséquent un rôle photorécepteur des porphyrines semble exclu ; aussi l'excrétion, en aérobiose, de coproporphyrine III par des levures rouges représente à notre connaissance un phénomène entièrement nouveau qui semble lié à la caroténogénèse.

(*) Communication personnelle.

CHAPITRE VII

DISCUSSION ET INTERPRETATION DE NOS RESULTATS.

Au cours de notre travail, un certain nombre de faits nouveaux ont pu être dégagés concernant tout particulièrement les caroténoïdes cycliques, dont le mode de formation reste un des points les plus discutés. Si PORTER et coll. (48-49) suggèrent chez les tomates la transformation des polyènes acycliques en pigments cycliques, celle-ci est nettement contestée par PURCELL (50). Chez les microorganismes ce problème n'est pas davantage élucidé ; ainsi chez *Neurospora crassa*, QUACKENBUSH et coll. (34) ont montré récemment que le phytoène, polyène acyclique, ne pouvait être un précurseur des caroténoïdes en l'occurrence des pigments cycliques. Ces résultats étayaient les hypothèses de quelques auteurs qui suggèrent que la synthèse des caroténoïdes cycliques s'effectue par des voies indépendantes pour chaque pigment : pour les uns c'est au niveau des unités en C20 que se produit la cyclisation, pour les autres, elle se fait au niveau d'un précurseur commun relativement saturé. Mais il faut remarquer que la plupart des auteurs considèrent que la formation des caroténoïdes cycliques s'effectue à partir de polyènes tétraterpéniques acycliques tels que le neurosporène ou le lycopène (58-62-13).

Chez un mutant de *Rh. mucilaginosa*, une étude récente (45) a démontré que ces carotènes acycliques proviennent du phytoène selon la filiation phytoène $\longrightarrow$ phytofluène $\longrightarrow$ ζ carotène $\longrightarrow$ neurosporène $\longrightarrow$ lycopène.

Nous avons pu identifier chez *Rh. mucilaginosa* et chez *Rh. aurantiaca*, en plus des caroténoïdes majeurs, le phytoène, le phytofluène, le ζ carotène et le neurosporène.

Cependant une étude de la composition des pigments des organismes ne nous a pas permis de résoudre les problèmes que pose l'interprétation d'une filiation entre les caroténoïdes. Nous avons alors modifié les conditions de culture et avons ainsi pu constater une très nette variation de la biosynthèse de ces composés chez les souches étudiées. C'est ainsi que nous avons réussi à mettre en évidence le lycopène chez les deux mutants RO₁ et RJ₁ de *Rh. mucilaginosa*. De plus en faisant varier la température d'incubation, nous avons pu montrer qu'il est possible d'entrevoir une interconversion des polyènes acycliques en pigments cycliques. Celle-ci semble s'effectuer selon deux voies :

Neurosporène $\longrightarrow$	lycopène $\longrightarrow$	γ carotène
ou bien		
Neurosporène $\longrightarrow$	β zéacarotène $\longrightarrow$	γ carotène.

Chez *Phycomyces* et chez les levures, seule la dernière voie est de nos jours la plus généralement admise, car le β zéacarotène est soit synthétisé à un taux plus abondant que le lycopène, soit plus fréquemment mis en évidence que le lycopène.

En effet, si la présence du lycopène chez *Phycomyces* est signalée, du fait de sa très faible concentration, il n'a jamais été envisagé en tant que précurseur de γ carotène, et chez les levures ce rôle n'a jamais été démontré. En outre, ce rôle est rejeté par DAVIES (12) chez *Rhizophlyctis rosea*, car en cultivant ce champignon en présence de ^{14}C mévalonate l'activité spécifique du γ carotène est nettement inférieure à celle du lycopène, alors qu'elle devrait être au moins égale. En outre, lorsque le γ carotène apparaît, ni le taux de lycopène, ni son activité spécifique ne baissent.

Au cours de nos essais, même en modifiant les conditions de culture, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence de lycopène, ni chez *Rh. aurantiaca*, ni chez *Rh. mucilaginosa*, souche RMP.

Mais la faible teneur ou même l'absence apparente de lycopène chez de nombreux organismes en fin de culture, et donc chez les levures, ne nous paraît pas être un argument suffisant pour exclure la participation de ce pigment à la biosynthèse des caroténoïdes cycliques. Il suffit en effet que la vitesse de transformation du lycopène soit supérieure à sa vitesse de formation pour que sa caractérisation dans les cellules devienne impossible. C'est pourquoi, pour déterminer l'origine et une éventuelle filiation des caroténoïdes cycliques dans nos souches, nous avons été amené à entreprendre une étude cinétique de l'évolution des pigments à partir d'un précurseur : le phytoène.

Au cours de cette cinétique nous avons constaté l'apparition du lycopène dans la souche mère RMP et avons montré que ce pigment est un intermédiaire dans la synthèse des pigments cycliques.

De plus chez *Rh. aurantiaca*, dans les mêmes conditions opératoires, le lycopène apparaît et nous avons vu que 86 % de la synthèse du γ carotène peut s'effectuer à partir de ce pigment ; aussi ce dernier ne doit-il plus être exclu de la filiation.

Chez *Rh. mucilaginosa* RMP, la vitesse de transformation du lycopène est élevée et nous pensons que dans les mutants RO_1 et RJ_1 , celle-ci se trouve diminuée, ce qui explique que ce pigment peut être caractérisé en culture. Enfin il existe un mutant RJPY de cette levure incapable d'effectuer la synthèse de pigments cycliques et dans lequel la teneur en lycopène est très élevée ($65 \mu\text{g/g}$ de levure sèche) (63).

Le passage γ carotène $\longrightarrow$ β carotène bien que jamais démontré est communément admis ; par notre étude cinétique nous entrevoyons éga-

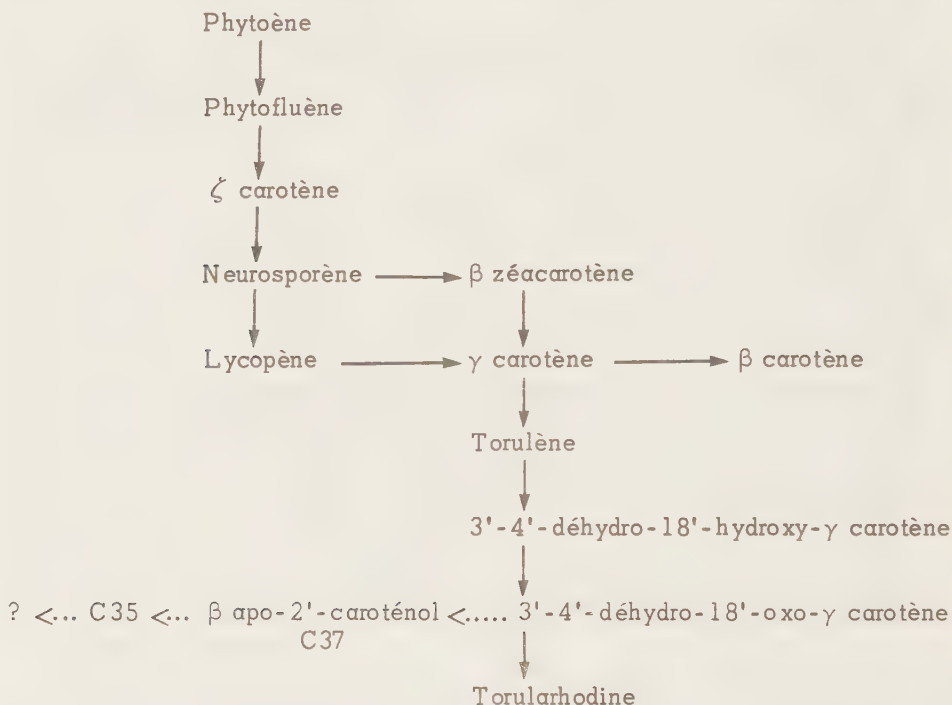
lement cette transformation chez *Rh.mucilaginos*a et *Rh.aurantiaca*. Dans le cas du mutant RJ_1 où la formation de la torularhodine est plus réduite que dans la souche mère RMP quelles que soient les conditions opératoires, la synthèse du γ carotène et de β carotène est stimulée. D'autre part, dans certaines expériences, en abaissant la température à 15°, nous avons noté une nette accumulation du γ carotène et une baisse du β carotène, du torulène et de la torularhodine ; au contraire à 30° le phénomène inverse se produit et ceci fait apparaître que le γ carotène peut donc bien être le pré-curseur de ces trois derniers pigments.

Après la découverte du torulène par E. LEDERER (37) et à la suite de la détermination exacte de sa structure chimique et de celle de la torularhodine, la transformation γ carotène $\longrightarrow$ torulène $\longrightarrow$ torularhodine a été proposée. WINTERSTEIN et coll. (67), qui sont les seuls à avoir mis en évidence le 3'-4' déhydro-18'-oxo- γ carotène dans un microorganisme non désigné, émettent l'hypothèse que cette transformation se fait par l'intermédiaire de cet aldéhyde. Nous avons identifié ce pigment dans les deux espèces de *Rhodotorula* étudiées. Mais la synthèse de cet aldéhyde en C40 nécessite l'oxydation d'un groupement méthyle terminal du torulène. Celle-ci peut se produire selon un mécanisme semblable à celui de l'oxydation du méthyle terminal de l'octane au cours de sa transformation en acide octanoïque (2), en passant par les stades alcool primaire puis aldéhyde. Aussi la première étape de l'oxydation du torulène doit donc être la formation d'un alcool primaire, et dans les deux levures il nous a été possible de caractériser le 3'-4'-déhydro-18'-hydroxy- γ carotène qui n'avait jamais été signalé à l'état naturel.

Chez *Rh.mucilaginos*a ce mécanisme d'oxydation du torulène en torularhodine semble trouver une confirmation par le fait que dans le mutant orange RO_1 , qui ne synthétise plus de torularhodine, les deux intermédiaires envisagés se trouvent à des taux nettement plus élevés que dans la souche mère. De plus l'étude cinétique réalisée avec la levure *Rh.aurantiaca* nous montre que la torularhodine qui se forme peut provenir du torulène.

Enfin WINTERSTEIN a également proposé une hypothèse dans laquelle il suggère que la formation des pigments, qui ont une chaîne carbonée inférieure à 40 carbones, peut résulter de la dégradation du squelette tétraterpénique à partir de l'aldéhyde en C40. Or lorsque la torularhodine ne se forme pas, comme nous le constatons dans le mutant RO_1 , nous avons mis en évidence dans cette souche un alcool en C37, le β -apo-2' caroténol, et des caroténoïdes de nature aldéhydique, dont la longueur de la chaîne semble être inférieure à C40. Aussi n'est-il pas impensable que de tels caroténoïdes se forment dans le mutant RO_1 selon la voie proposée par WINTERSTEIN.

Tous ces résultats et en particulier les études cinétiques mettent en lumière qu'il existe chez les caroténoïdes de nos levures une filiation qui peut se schématiser ainsi :



C'est à notre connaissance la première fois que la présence de tous ces caroténoïdes est signalée dans une même espèce de *Rhodotorula*.

En étudiant l'action de diverses substances sur la caroténogénèse de *Rh. mucilaginosa*, nous avons pu observer une action notablement différente de celle jusqu'à présent constatée tant chez *Rh. glutinis* que chez *Phycomyces blakesleanus*. Ainsi la β ionone chez *Rh. mucilaginosa* agit plutôt comme un médiateur d'une photooxydation des pigments et nullement en tant qu'inhibiteur de la synthèse des pigments cycliques comme chez *Rh. glutinis*, ou en tant que stimulateur de la synthèse du β carotène comme chez *Phycomyces*. D'autre part, nous avons montré que le 2-hydroxybiphényle inhibe la formation des caroténoïdes chez *Rh. mucilaginosa*, *Rh. aurantiaca* et provoque l'accumulation du phytoène. Chez *Phycomyces blakesleanus*, le 2-hydroxybiphényle ralentit la croissance comme chez

les levures, mais n'influence pas la caroténogénèse, et dans ce cas également, l'action diffère de celle observée sur les levures.

Nous avons été fort surpris de constater que des inhibiteurs des phénomènes respiratoires tels que le cyanure et l'acide déhydroacétique sont sans effet sur la biosynthèse des caroténoïdes ; or la caroténogénèse, dont la plupart des réactions sont des déshydrogénations, ne peut se produire qu'en présence d'oxygène, car aucune évolution des pigments n'est observée en tampon sous atmosphère d'azote ou de CO_2 .

A cela il faut ajouter que l'excrétion de porphyrines concomitante d'une baisse de la formation de torularhodine, l'influence de l'aération sur le taux d'excrétion de porphyrines et sur la synthèse de la torularhodine, indiquent que des enzymes de nature hémoprotéique semblent impliqués dans la caroténogénèse chez les levures que nous avons étudiées.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ABOOD L.G. et GERARD R.W.
J. Pharm. Exp. Therap. 1953, 108, 261.
- (2) BAPTIST J.N., GHOLSON R.K. et COON M.J.
Biochem. Biophys. Acta, 1963, 69, 40.
- (3) BASSEL E.W. et TANENBAUM S.W.
Biochem. Biophys. Acta. 1958, 28, 247.
- (4) BATRA P.P. et RILLING H.C.
Arch. Biochem. Biophys. 1964, 107, 485.
- (5) BOBKOVA T.S.
Prikl. Biokhim i Mikrobiol 1965, 1 (3), 316.
- (6) BONNER J., SANDOVAL A., TANG YM. et ZECHMEISTER L.
Arch. Biochem 1946, 10, 113.
- (7) BROWN H.C.
J. of Chem. Educ. 1961, 38, 173.
- (8) BUCHI G., JUMAN C.G. et LIPINSKY E.S.
J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 4327.
- (9) BURCHARD R.P. et DWORKIN M.
J. of Bact. 1966, 91, 535.
- (10) CONWAY E.J. et BREEN J.
Biochem. J. 1945, 39, 368.
- (11) CORNFORTH J.W., CORNFORTH R.H., DONNINGER C., POPJAK C.
et RYBACK G.
Proc. Roy. Soc. 1966, 163, 492.
- (12) DAVIES B.H.
Phytochemistry. 1961, 1, 25.
- (13) DECKER K. et UEHLEKE H.
Hoppe Seyl. Z. 1961, 323, 61.

- (14) EGGER K.
Chromatographie Symposium II, 1962, 75.
- (15) EMERSON E.
J. of Organ. Chem. 1943, 8, 417.
- (16) ERIKSEN L.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1953, 5, 155.
- (17) FROMAGEOT Cl. et TCHANG J.L.
Arch. Mikrobiol. 1938, 9, 424.
- (18) GAJDOS A. et GAJDOS-TORÖK M.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1963, 45, 857 et 1227.
- (19) GOODWIN T.W.
The comparative Biochemistry of the Carotenoids. Chapmsn Hall
ltd. 1952.
- (20) GOODWIN T.W.
Biochem. J. 1952, 50, 550.
- (21) GOODWIN T.W.
Experientia. 1953, 10, 213.
- (22) GOODWIN T.W. et OSMAN H.G.
Biochem. J. 1953, 53, 541.
- (23) GOODWIN T.W.
Biochem. J. 1956, 62, 348.
- (24) GOODWIN T.W.
Biochem. J. 1965, 96, 2P.
- (25) GOODWIN T.W.
Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Academie Press.
1965.
- (26) GROB E.C.
Biosynthesis of Terpenes and sterols. Ciba Foundation Symposium.
1959. 267.
- (27) HAXO F.
Arch. Biochem. 1969, 20, 400.

- (28) ISLER O., GUEX W., RÜEGG R., RYSER G., SAUCY G., SCHWIETER U.
WALTER M. et WINTERSTEIN A.
Helv. Chim. Acta. 1961, 42, 864.
- (29) JENSEN S.L.
Thèse Trondheim. 1962.
- (30) JENSEN J.
J. Chromato. 1963, 10, 236.
- (31) JENSEN S.L.
Phytochemistry. 1965, 4, 925.
- (32) KANDUTSCH A.A., PAULUS H., LEVIN E. et BLOCH K.
J. Biol. Chem. 1964, 239, 2507.
- (33) KARER P. et RUTSCHMANN J.
Helv. Chim. Acta. 1943, 26, 2109. 1945, 28, 795. 1946, 29, 355.
- (34) KARUNAKARAN A., KARUNAKARAN M.E. et QUACKENBUSH
Arch. Biochem. Biophys. 1966, 114, 326.
- (35) KOE B.K. et ZECHMEISTER L.
Arch. Biochem. Biophys. 1952, 41, 236.
- (36) LASCELLES J.
The Bacteria III. 1962, p. 334. Ac Press N.Y. London.
- (37) LEDERER E.
Compt. Rend. 1933, 197, 1694. Compt. Rend. Soc. Biol. 1933, 117,
1083.
- (38) MACKINNEY G., NAKAYAMA T., BUSS C.D. et CHICHESTER C.O.
J. Am. Chem. Soc. 1952, 74, 3456.
- (39) MACKINNEY G., CHICHESTER C.O. et WONG P.S.
Arch. Biochem. Biophys. 1954, 53, 479.
- (40) MACKINNEY G.
Metabolic Pathways. ed. D.M. GREENBERG. Ac. Press. N.Y. 1960
- (41) NAKAYAMA T., MACKINNEY G. et PHAFF H.J.
Ant. V. Leeuw. J. Microbiol. Serol. 1954, 20, 217.

- (42) NAKAYAMA T.O.M.
Arch. Biochem. Biophys. 1958, 75, 356.
- (43) NASH H.A. et QUACKENBUSCH F.W. et PORTER J.W.
J. Am. Chem. Soc. 1948, 70, 3613.
- (44) NUSBAUM-CASSUTO E., VILLOUTREIX J. et BONALY R.
Pre-symposium Carotenoids other than vitamin A. Trondheim. 1966.
11.
- (45) NUSBAUM-CASSUTO E., VILLOUTREIX J. et MALENGE J.P.
Biochem. Biophys. Acta. 1967 sous presse.
- (46) PETERSON W.J., BELL T.A. ETCHELLS J.L. et SMART W.W.G.
J. of Bact. 1954, 67, 708.
- (47) PETZOLD E.N., QUACKENBUSCH F.W. et QUISTAN M.
Arch. Biochem. Biophys. 1959, 82, 117.
- (48) PORTER J.W. et LINCOLN R.E.
Arch. Biochem. 1950, 27, 390.
- (49) PORTER J.W. et ANDERSON D.G.
Arch. Biochem. Biophys. 1962, 97, 520.
- (50) PURCELL A.E.
Arch. Biochem. Biophys. 1964, 105, 606.
- (51) RABOURN W.J. et QUACKENBUSCH F.W.
Arch. Biochem. Biophys. 1953, 44, 159.
- (52) REXES P., CHICHESTER C.O., NAKAYAMA T.O.M.
Biochem. Biophys. Acta. 1964, 90, 578.
- (53) RILLING H.C.
Arch. Biochem. Biophys. 1965, 110, 39.
- (54) RÜEGG R., MONTAVON M., RYSER G., SAUCY G., SCHWIETER V. et ISLER O.
Helv. Chim. Acta. 1959, 42, 854.
- (55) RÜEGG R., SCHWIETER V., RYSER G., SCHUDEL P. et ISLER O.
Helv. Chim. Acta. 1961, 44, 994.

- (56) SILVESTEIN E.
Biochem. Pharmacol. 1962, 12, 431.
- (57) SIMPSON K.L., NAKAYAMA T.O.M. et CHICHESTER C.O.
Biochem. J. 1964, 92, 508.
- (58) SIMPSON K.L., NAKAYAMA T.O.M. et CHICHESTER C.O.
J. of Bact. 1964, 88, 1688.
- (59) SLONIMSKI P.
Actualités biochimiques. n° 17. 1953.
- (60) SLONIMSKI P.
Biochem. Bruxelles. 1955, p. 242.
- (61) UEHLEKE H. et DECKER K.
H.S. Zeit Phys. Chemie. 1962, 327, 225.
- (62) VALADON L.R.G. et HEALE J.B.
J. Gen. Microbiol. 1965, 41, 341.
- (63) VILLOUTREIX J.
Thèse Doctorat ès Sciences. Nancy. 1960.
- (64) VILLOUTREIX J.
Biochem. Biophys. Acta. 1960, 40, 442.
- (65) WEEDON B.C.L.
in Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Academie Press.
London. 1965. p. 75.
- (66) WENT F.W., LE ROSEN A. et ZECHMEISTER L.
Plant. Physiol. 1942, 17, 91.
- (67) WINTERSTEIN A., STUDER A. et RÜEGG R.
Chem. Bericht. 1960, 7, 2951.
- (68) WITTMAN H.
Arch. Mikrobiol. 1956, 25, 373.
- (69) ZALOKAR M.
Arch. Biochem. Biophys. 1955, 56, 318.

- (70) ZALOKAR M.
Arch. Biochem. 1957, 70, 561.
- (71) ZEICHMEISTER L.
Chem. Revs. 1944, 34, 267.
- (72) ZEICHMEISTER L.
Cis. trans Isomeric carotenoids, vitamin A and arylpolyenes.
Springer Verlag 1962.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. <i>Matériel et Méthodes</i>	5
a) Matériel : microorganismes	5
solvants utilisés	5
adsorbants	6
b) Méthodes : conservation des souches	6
culture des microorganismes	6
cellules non proliférantes	7
inhibition de la caroténogénèse	7
élimination de l'inhibiteur	7
levée d'inhibition	7
extraction des caroténoïdes	8
séparation et identification des caroténoïdes	8
dosage des caroténoïdes	12
CHAPITRE II. <i>Etude des pigments de Rhodotorula Mucilaginosa</i>	13
Etude des caroténoïdes de la souche RMP	13
Etude des caroténoïdes du mutant RO ₁	15
Etude des caroténoïdes du mutant RJ ₁	19
CHAPITRE III. <i>Influence des conditions de culture sur la pigmentation.</i> ..	21
Influence de la lumière sur la pigmentation de Rh. mucila- ginosa	21
Influence du mode de culture	22
Influence de la température	27
CHAPITRE IV. <i>Action de différents agents chimiques sur la caroté- nogénèse</i>	33
Action de la β ionone, de la méthylhepténone et de la benzophé- none sur Rh. mucilaginosa	33
Action de l'acide déhydroacétique sur la caroténogénèse	37
Action du 2-hydroxybiphényle	39
Conclusion	40

CHAPITRE V. <i>Etude cinétique de la synthèse des caroténoïdes</i>	41
Introduction	41
Etude de l'évolution des pigments chez Rh. mucilaginosa RMP..	45
Etude de l'évolution des pigments chez le mutant RO ₁	47
Etude de la variation des pigments de Rh. aurantiaca	50
CHAPITRE VI. <i>Excrétion de porphyrines par des souches normales et mutantes de Rhodotorula mucilaginosa</i>	57
Nature des porphyrines excrétées	57
a) extraction	57
b) identification	57
Dosage des porphyrines	58
Etude de l'excrétion des porphyrines	58
CHAPITRE VII. <i>Discussion et interprétation de nos résultats</i>	63
BIBLIOGRAPHIE	69

Nom de l'Etudiant : BONALY Roger

Nature de la Thèse : DOCTORAT ES SCIENCES

Titre de la Thèse : BIOSYNTHESE DES CAROTENOIDES CYCLIQUES
DE LEVURES DU GENRE RHODOTORULA

Vu et Approuvé

Nancy le 3 Mai 1967

Le Doyen

J. AUBRY

Vu et Permis d'imprimer

Nancy le 5 Mai 1967

Le Recteur

Président du Conseil de

l'Université

P. IMBS

Cet exemplaire est imprimé
à des fins particulières et ne
peut en aucun cas être vendu.

Achevé d'imprimer le 28 Février 1968
à l'atelier de Documentation Universitaire
3, Rue Sellier, 3 NANCY

Dépot légal N° 316 Faculté des Sciences Editeur
1er trimestre 1968

